

**Nach-Ernte induzierte Genexpression in der Zuckerrübe
(*Beta vulgaris* L.)**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Alexander Rotthues
aus Hildesheim

1. Referent:	Prof. Dr. Reinhard Hehl
2. Referent:	Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel
eingereicht am:	30. Januar 2006
mündliche Prüfung (Disputation) am:	09. Juni 2006
	2006

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs für Biowissenschaften und Psychologie, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Patente

Hehl, R., Rotthues, A., Stahl, D.:

"Lagerungsinduzierter Promotor"

Nummer/Aktenzeichen: 10 2004 057 291.7

Anmeldetag/Prioritätsdatum: 26.11.2004

Tagungsbeiträge

Rotthues, A., Stahl, D., Kloos, DU., Hehl, R.:

Nach-Ernte-Induktion potentiell Resistenz verbessernder Gene bei Zuckerrüben. Vortrag. 18. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen (2005)

1	Einleitung	1
1.1	Die Zuckerrübe	1
1.2	Lagerung pflanzlicher Organe.....	2
1.3	Stoffwechselphysiologische Effekte bei der Lagerung von Zuckerrüben	5
1.4	Saccharoseabbauende Enzyme der Zuckerrübe.....	8
1.5	Biotechnologische Reduktion der lagerungsbedingten Invertzucker- akkumulation.....	9
1.6	Ziele dieser Arbeit.....	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Enzyme	13
2.2	Kits.....	13
2.3	Plasmide	13
2.4	Genomische Zuckerrübenbank.....	14
2.5	Bakterienstämme	14
2.6	Pflanzenlinien	15
2.7	Oligonukleotide	15
2.8	Pflanzenmaterial	17
2.8.1	Pflanzenmaterial aus kontrolliert gelagerten Zuckerrüben.....	17
2.8.2	Pflanzenmaterial aus der Feldmiete	18
2.8.3	Gewebeproben aus Zuckerrüben in der Wachstumsphase	18
2.9	RNA-Material aus Zuckerrüben	18
2.10	Genetisches Material einer Forward- und einer Reverse-Subtraktion	19
2.11	SSH-Fragmente Nach-Ernte induzierter Gene	19
2.12	Molekularbiologische Methoden	20
2.13	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	21
2.14	Arbeiten mit RNA	21
2.14.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
2.14.2	Isolierung von PolyA+ mRNA	22
2.14.3	Konzentrationsmessung von RNA-Präparationen	22
2.14.4	Semiquantitative RT-PCR zur Aufnahme von Expressionsprofilen.....	22
2.14.5	Northern-Blot Analyse.....	23
2.15	Erstellung einer cDNA Bank Nach-Ernte induzierter Gene der Zuckerrübe	24
2.16	RACE-PCR zur Identifizierung 5' vollständiger cDNA-Fragmente	24
2.17	Isolierung genomischer Klone.....	25

2.18	Promotor-Luciferase Reportergenkonstrukte zur Expressionsanalyse in transgenen Zuckerrüben	26
2.19	T-DNA-Konstrukte Nach-Ernte induzierter Gene zur Überexpression in <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
2.20	Bioinformatische Nukleotidsequenz-Analyse	38
2.20.1	Sequenzvergleichende Promotor-Analyse mit dem Programm "consensus"	38
2.20.1.1	Erzeugung von Zufallssequenzen definierter Länge und definierten AT-Gehalts.....	38
2.20.2	Matrizenbasierte Sequenzanalyse mit dem Programm "patser matrices"...	39
2.20.3	Bioinformatische Analyse von 5'-UTR Sequenzen.....	41
2.21	Bioinformatische Tools zur Vorhersage subzellulärer Proteinlokalisierungen	42
2.22	Bioinformatisches Tool zur Sekundärstrukturvorhersage einzelsträngiger RNA.....	42
2.23	<i>Arabidopsis thaliana</i> als heterologe Modellpflanze zur Genfunktionsanalyse	43
2.23.1	Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
2.23.2	Transformation mittels Floral-dip-Methode	43
2.23.3	Segregationsanalyse	44
2.23.4	Prüfung auf Transgenexpression in transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
2.23.5	Phänotypische Analysen.....	45
2.24	Statistische Methoden	45
2.24.1	Student's t-Test.....	46
2.24.2	Chi-Quadrat-Test (χ^2)	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Identifizierung, Isolierung und <i>in silico</i> Charakterisierung Nach-Ernte induzierter Gene der Zuckerrübe	49
3.1.1	Die Genprodukte der Nach-Ernte induzierten Gene können anhand ihrer Homologie mit verschiedenen Stresszuständen in Verbindung gebracht werden	49
3.1.2	Charakterisierung der Translationsprodukte Nach-Ernte induzierter Gene auf <i>in silico</i> Ebene	52

3.1.2.1	Die Peroxidase BvCPRX1 zählt zu den kationischen Peroxidasen und weist ein N-terminales Signalpeptid auf	53
3.1.2.2	Die Ribosomen inaktivierenden Proteine BvRIP-r1 und BvRIP-r2 weisen N-terminale Signalpeptide auf	54
3.1.2.3	Das Germin-like Protein BvGLP-r wird vermutlich sekretiert.....	54
3.1.2.4	Das integrale Membranprotein BvBPM1 zählt zur Klasse der intrinsischen Plasmamembran Proteine (PIP)	55
3.1.2.5	Die Chitinase BvSP2 trägt ein N-terminales Signalpeptid.....	56
3.1.2.6	Der Phytosulfokin- α -Precursor BvPSK weist neben einem N-terminalen Signalpeptid weitere charakteristische Merkmale auf.....	56
3.1.2.7	Das Cytochrom-b561-Protein BvC561R ist vermutlich in der Plasmamembran lokalisiert.....	57
3.1.2.8	Das Translationsprodukt des Gens <i>BvMARB</i> ist wahrscheinlich nukleär lokalisiert	57
3.1.2.9	Ein theoretisches Translationsprodukt des Gens <i>BvNPCG1</i> weist eine Spleißosom-ähnliche Peptidsequenz auf	58
3.1.2.10	Das nicht proteincodierende Transkript des Gens <i>BvNPCG3</i> enthält eine potentielle miRNA-Vorläufer Sekundärstruktur	59
3.2	Die Expressionsprofile der Nach-Ernte induzierten Gene sind heterogen und in Klassen einteilbar.....	61
3.2.1	Expressionsprofile der fünf spät induzierten Gene <i>BvNPCG1</i> , <i>BvB12D</i> , <i>BvGLP-r</i> , <i>BvSP2</i> und <i>BvWDRP</i>	62
3.2.2	Expressionsprofile des schwach früh induzierten Gens <i>BvRIP-r2</i>	64
3.2.3	Expressionsprofile der sechs zu allen Zeitpunkten schwach exprimierten Gene <i>BvPSK</i> , <i>BvC561R</i> , <i>BvBPM1</i> , <i>BvRCC</i> , <i>BvMARB</i> und <i>BvNPCG3</i>	65
3.2.4	Expressionsprofile der vier früh induzierten und durchgehend exprimierten Gene <i>BvHSP83</i> , <i>BvCPRX1</i> , <i>BvRIP-r1</i> und <i>BvNPCG2</i>	68
3.2.5	Northern-Blot-Analyse der Gene <i>BvHSP83</i> , <i>BvCPRX1</i> , <i>BvRIP-r1</i> und <i>BvNPCG2</i>	70
3.3	Isolierung der Promotoren der Gene <i>BvHSP83</i> , <i>BvCPRX1</i> , <i>BvRIP-r1</i> und <i>BvNPCG2</i>	72
3.3.1	Die Promotoren der Gene <i>BvHSP83</i> , <i>BvCPRX1</i> , <i>BvRIP-r1</i> und <i>BvNPCG2</i> weisen eine TATA-Box auf	72

3.4	Bioinformatische Analyse zur Identifizierung <i>cis</i> -regulatorischer Elemente	75
3.4.1	Eine matrizenbasierte Suche nach bekannten Transkriptionsfaktorbindungsstellen ergab keine Hinweise auf gemeinsame Nach-Ernte spezifische Elemente	75
3.4.2	Eine vergleichende Sequenzanalyse der drei Promotoren P- <i>BvHSP83</i> , P- <i>BvRIP-r1</i> und P- <i>BvNPCG2</i> detektiert ein konserviertes 7bp-Motiv	78
3.4.3	Eine vergleichende Sequenzanalyse der 5' Bereiche von 16 Nach-Ernte induzierten Genen detektiert ein konserviertes 5bp-Motiv	81
3.4.4	Das konservierte 5bp-Motiv liegt signifikant häufiger in 5'-UTRs Nach-Ernte induzierter Gene vor als in Referenzsequenzen.....	82
3.5	Funktionsanalyse Nach-Ernte induzierter Gene der Zuckerrübe im heterologen System <i>Arabidopsis thaliana</i>	84
3.5.1	Wachstumsstimulierung durch Überexpression der <i>BvPSK</i> -cDNA in <i>Arabidopsis thaliana</i>	84
3.5.2	Die Überexpression der <i>BvCPRX1</i> - und <i>BvBPM1</i> -cDNAs in <i>Arabidopsis thaliana</i> führt zu keinen phänotypischen Veränderungen	88
4	Diskussion	90
4.1	Differentielle Nach-Ernte induzierte Genexpression in Zuckerrüben	90
4.1.1	Die frühe Induktion und die Homologie der Gene <i>BvCPRX1</i> , <i>BvRCC</i> , <i>BvMARB</i> und <i>BvPSK</i> lassen auf Wundheilungsprozesse schließen	90
4.1.2	Die Nach-Ernte induzierte Genexpression der Gene <i>BvCPRX1</i> und <i>BvC561R</i> lässt auf vorliegenden Sauerstoffstress schließen.....	94
4.1.3	Involvierung von sieben Nach-Ernte induzierten Genen in die Pathogenabwehr	95
4.1.4	Die Nach-Ernte induzierte Genexpression des Aquaporin-Gens <i>BvBPM1</i> weist auf Veränderungen im Wasserhaushalt gelagerter Zuckerrüben hin.....	101
4.1.5	Die Nach-Ernte induzierte Expression des Gens <i>BvB12D</i> deutet auf beginnende Seneszenz-Prozesse in gelagerten Zuckerrüben hin.....	102
4.1.6	Modell der Nach-Ernte induzierten Genexpression bei Zuckerrüben.....	103
4.1.7	Die Funktion des Nach-Ernte induzierten Gens <i>BvWDRP</i> lässt sich nicht eindeutig klären	105
4.1.8	Die Nach-Ernte induzierten Gene <i>BvNPCG1</i> , <i>BvNPCG2</i> und <i>BvNPCG3</i> sind möglicherweise nicht proteincodierend.....	105

4.1.9	Codiert <i>BvNPCG3</i> eine microRNA?.....	107
4.2	Die bioinformatische Analyse der Promotoren <i>P-BvHSP83</i> , <i>P-BvCPRX1</i> , <i>P-BvRIP-r1</i> und <i>P-BvNPCG2</i> deutet auf keinen gemeinsamen Regulationsmechanismus hin.....	110
4.3	Biotechnologische Anwendung des Nach-Ernte induzierbaren Promotors <i>P-BvRIPr1</i>	112
5	Zusammenfassung	114
6	Literatur	116
7	Anhang	129
7.1	Nukleotidsequenzen von vier Nach-Ernte induzierbaren Promotoren	129
7.2	cDNA Sequenzen der 16 Nach-Ernte induzierten Gene.....	136
7.3	Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests zur Bestimmung der T-DNA-Loci Anzahl transgener <i>Arabidopsis</i> Linien	154
7.4	Klassenzuordnung der quantifizierten Blattgrößen von vier <i>BvPSK</i> -cDNA überexprimierenden <i>A. thaliana</i> Linien und dem Wildtyp ...	155
7.5	Peroxidaseaktivitätsmessungen von transgenen Überexpressionslinien des Nach-Ernte induzierten Peroxidase Gens <i>BvCPRX1</i>	155
7.6	Quantifizierte Blattgrößen transgener Pflanzen von zwei Überexpressionslinien des Nach-Ernte induzierten Gens <i>BvBPM1</i> und von <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp unter mannitolvermitteltem Trockenstress	155
7.7	DNA- / Glycerinkultur- / Samenverzeichnis.....	156

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
Acc.	Accession
ACO	1-Amino-Cyclopropan-1-Carboxylsäure-Oxidase
ACS	1-Amino-Cyclopropan-1-Carboxylsäure-Synthetase
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Bv	<i>Beta vulgaris</i>
BvBPM1	<i>Beta vulgaris</i> Beta Plasma Membrane 1
BvC561R	<i>Beta vulgaris</i> Cytochrom 561 Related
Bvcab	<i>Beta vulgaris</i> chlorophyll a/b binding
BvCPRX1	<i>Beta vulgaris</i> Cationic Peroxidase
BvGLP-r	<i>Beta vulgaris</i> Germin Like Protein-root
BvHis1-r	<i>Beta vulgaris</i> Histon1-root
BvHSP83	<i>Beta vulgaris</i> Heat Shock Protein 83
BvMARB	<i>Beta vulgaris</i> Matrix Attached Region Binding
BvMII	<i>Beta vulgaris</i> Major-latex-like
BvNPCG	<i>Beta vulgaris</i> Non Protein coding Gene
BvNPCG3i	<i>Beta vulgaris</i> Non Protein coding Gene 3 intronhaltig
BvPSK	<i>Beta vulgaris</i> Phytosulfokin
BvRCC	<i>Beta vulgaris</i> Regulator of Chromosome Condensation
BvRIP	<i>Beta vulgaris</i> Ribosome Inactivating Protein
BvSmp	<i>Beta vulgaris</i> Small protein
BvTlp	<i>Beta vulgaris</i> Thaumatin-like protein
BvWDRP	<i>Beta vulgaris</i> WD40 Repeat Protein
C	Cytidin
ca.	circa
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	complementary DNA
cfu	colony forming unit
Ch1	Chitinase 1
Ci	Curie
CWI	Cell Wall Invertase
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
dd	doppelt destilliert
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Elongationsfaktor
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	et alii
etc.	etcetera
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
ExPASy	Expert Protein Analysis System

g	Gramm
g	gravity
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	hour
IAA	Indole-3-Acetic Acid
inkl.	inklusive
Inv-CW	Invertase-Cell Wall
Inv-N	Invertase-Neutral
Inv-V	Invertase-Vakuolär
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasen
kcal	Kilokalorien
kDa	Kilo Dalton
KWS	Kleinwanzlebener Saatzucht
l	Liter
LB	Luria Broth
luc	Luciferase
LUC	Luciferase
N	Stickstoff
NaOAc	Natriumacetat
nt	Nukleotide
m	Milli
M	Molar
μ	Micro
min	Minute
miRNA	Micro RNA
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige Skoog
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCR	Polymerase Chain Reaction
pers.	persönliche
pH	potentia Hydrogenii
PHI	Post Harvest Induced
PIP	Plasmamembrane Intrinsic Protein
PLACE	plant <i>cis</i> -acting regulatory element
PPD	Post-harvest Physiological Deterioration
PR	Pathogenesis related
Protox	Protoporphyrinogen-Oxidase
PTGS	Posttranskriptionelles Gene-Silencing
PVX	Potato Virus X
RACE-PCR	Rapid Amplification of cDNA End - PCR
RE	Restriktionsenzym
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease

ROS	Reactive Oxygen Species
R-Protein	Resistenz-Protein
RSAT	Regulatory Sequence Analysis Tools
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions - PCR
s	Sekunde
S	Svedberg
SAG	Seneszenz assoziiertes Gen
SAR	Systemic Acquired Resistance
SBSS	Sugar Beet Sucrose Synthase
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
spez.	Spezifisch
ss	single stranded
SSC	Standard Saline Citrat
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
SuSy	Sucrose Synthase
T	Thymidin
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFB-site	Transkriptionsfaktorbindungsstelle
TSS	Transcription Start Site
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Uracil
UDP	Uridindiphosphat
UTR	Untranslated Region
v/v	Volumen/Volumen
VI	Vakuoläre Invertase
VIGS	Virus induziertes Gene-Silencing
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Zuckerrübe

Die in der landwirtschaftlichen Industrie als Kulturpflanze eingesetzte weißschalige Zuckerrübe (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *altissima*) gehört zur Familie der *Chenopodiaceae* (Keller, 1999; Strasburger, 1999). Im Jahr 1747 erkannte Andreas Sigismund Marggraf, dass der Rübenzucker der heimischen Runkelrübe (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *alba*), die von der im Mittelmeerraum wachsenden Urform *Beta vulgaris* L. abstammt, mit dem zu damaligen Zeiten importierten Rohrzucker identisch ist. In beiden Fällen handelt es sich um das Disaccharid Saccharose (β -D-Fructofuranosyl- α -D-Glucopyranosid), dessen Monomere α -D-Glucose und β -D-Fructose α,β -1,2-glycosidisch verknüpft sind. Marggrafs wissenschaftlicher Nachfolger Franz Carl Achard vermochte durch Auslese und Vermehrung zuckerreicher Rüben den Zuckergehalt von 1,6% auf 5% zu steigern und somit die Ausgangsform heute genutzter Zuckerrübensorten zu etablieren (Achard, 1809). Nicht zuletzt durch die von Napoleon eingeführte Kontinentalsperre, die den Handel mit England unterband und somit die Einfuhr von Rohrzucker aus britischen Kolonien verhinderte, wurden Anbau, züchterische Optimierung und technische Verarbeitung der Zuckerrüben in Europa vorangetrieben. Es entstand ein bis heute vorliegender Landwirtschaftszweig, der stetigen Verbesserungen unterliegt. Wirtschaftspolitisch ist Rübenzucker insofern umstritten, als sein Absatz europaweit durch Subventionen und die Erhebung von Einfuhrzöllen auf den günstiger produzierten Rohrzucker gesichert wird. Durch die Reformierung der noch bestehenden EU-Zuckermarktordnung soll der Absatz des Rübenzuckers in den kommenden Jahren schrittweise den Bedingungen des globalen Marktes angepasst werden. Ungeachtet der wirtschaftspolitischen Aspekte stellt die Zuckerrübe aus pflanzenphysiologischer Sicht weiterhin eine Alternative zum Zuckerrohr dar. Der maximale Saccharose-Gehalt heutiger Zuckerrübensorten liegt bei 20%; im Fall des Zuckerrohrs werden Werte von 16% erreicht (van der Poel, 1998).

Die Zuckerrübe ist eine zweijährige Pflanze. Nach Aussaat und Keimung werden im ersten Vegetationsjahr die Blätter ausgehend vom Epikotyl sowie die Rübe ausgehend von Hypokotyl (Hals) und Hauptwurzel gebildet (Keller, 1999; Munk, 2001). Aus zuckertechnologischer Sicht wird unter dem Begriff "Rübe" die Hauptwurzel und der Hals verstanden (van der Poel, 1998). In der Botanik werden generell Speicherorgane unterschieden, die nur aus einem Organ entstehen und als

Knollen bezeichnet werden und solche, die aus mehreren Organen entstehen und den Begriff Rüben tragen (Munk, 2001). Da das Speicherorgan der Zuckerrübe vornehmlich durch sekundäres Dickenwachstum aus der Hauptwurzel entsteht, wird dieses als Wurzelrübe bezeichnet. Im Zuge der Entwicklung werden um das Ausgangskambium 12-15 ringförmige sekundäre Kambien gebildet. Diese bestehen alternierend aus vaskulären und parenchymatischen Bereichen, wobei die vaskulären Zonen in Phloem, Xylem und parenchymatische Zellen zu unterscheiden sind (Elliot und Weston, 1993). In den Vakuolen der parenchymatischen Zellen der Zuckerrübe werden die Photosyntheseassimilate in Form von Saccharose gespeichert, es liegen ca. 100fach höhere Konzentrationen als im Cytoplasma vor (Snyder und Tolbert, 1966). Die Saccharose wird als Transportzucker von den Blättern über das Phloem zum Speicherorgan transportiert. Sie dient im zweiten Vegetationsjahr als Energiereservoir, wenn die Zuckerrübe nach Einwirkung niedriger Temperaturen (Vernalisation) in die generative Entwicklungsphase mit Schossen, Blüten und anschließender Samenbildung eintritt. In der landwirtschaftlichen Industrie erfolgt die Ernte der Zuckerrüben noch vor Einleiten der generativen Entwicklungsphase. Die zuckerrübenverarbeitende Industrie verwertet nur die Wurzelrübe, Blätter und Epikotyl werden bei der Ernte mechanisch entfernt. Mit den Begriffen der geernteten und gelagerten Zuckerrübe ist somit stets die Wurzelrübe gemeint.

Zwischen Ernte der Zuckerrübe und Verarbeitung liegt eine Lagerungsperiode, die mit einer Abnahme des Saccharose-Gehalts einhergeht (Kapitel 1.3).

1.2 Lagerung pflanzlicher Organe

Einen entscheidenden Einfluss auf die Lagerfähigkeit pflanzlicher Organe hat, neben den nicht mehr natürlichen Umgebungsbedingungen, die vorherige physiologische Bedeutung der Organe als Teil der intakten Pflanze. Unter Lagerfähigkeit wird in diesem Zusammenhang die Stärke der Ausprägung der intrinsischen Fähigkeit des von der intakten Pflanze isolierten Organs verstanden, den Stoffwechsel so zu regulieren, dass ein Verderb möglichst spät einsetzt. Laut Nilsson (2000) lassen sich pflanzliche Organe nach ihrer Lagerfähigkeit in drei Gruppen einteilen.

Gruppe 1 umfasst pflanzliche Organe, die nicht zur Überdauerung konzipiert sind, wobei der Begriff Überdauerung das biologische Analogon zur nicht natürlichen

Lagerung darstellt. In Gruppe 2 fallen die Früchte und Gruppe 3 beinhaltet Speicherorgane.

Zu Gruppe 1 zählt das photosynthetisch aktive Gewebe der Blätter, aber auch Petiolen, Stengel, Sprosse, Knospen und Blüten. Nach der Ernte, die in der Regel mit einem Abtrennen des entsprechenden Organs einhergeht, verlieren die Gewebe Wasser und nach Aufbrauchen der noch verfügbaren Kohlenhydratreserven kommt der Stoffwechsel weitestgehend zum Erliegen, so dass Seneszenz-Prozesse einsetzen. Neben den unmittelbaren physiologischen Veränderungen wie dem Wasserverlust kommt es somit auch zu Veränderungen auf der Genexpressionsebene. Coupe *et al.* (2003) haben gezeigt, dass bei Infloreszenzen von Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) nach der Ernte eine Induktion von Cystein-Protease-Genen erfolgt, die zu den Seneszenz assoziierten Genen (SAG) zählen. Diese Induktion wird verzögert durch die externe Zugabe von Saccharose und Wasser, wodurch sich die Lagerfähigkeit der Broccoli-Blütenstände verbessern lässt. Weiterhin haben Nishikawa *et al.* (2003) gezeigt, dass in Broccoli eine Nach-Ernte Repression Ascorbat-synthetisierender Enzyme vorliegt. Ascorbat fungiert als so genannter Radikalfänger (Antioxidant) und wirkt einer Schädigung von Zellbestandteilen durch sauerstoffradikalvermittelte unkontrollierte Oxidation entgegen. Wird nun Ascorbat nicht mehr gebildet, verlieren die Zellen in den geernteten Broccoli-Infloreszenzen einen ihrer Schutzmechanismen gegen Sauerstoffradikale und es erfolgt ein schnellerer Verderb.

Im Fall des Spargels wird ein Teil der Sprossachse geerntet. Nach der Ernte sinken die Zucker- und Proteinkonzentrationen, während die Asparaginkonzentration durch verstärkte Expression der Asparaginsynthetase steigt (Davies *et al.*, 1996; Davies und King, 1993). Ebenso erfolgt eine Nach-Ernte Induktion von Peroxidasen, welche an der Lignifizierung beteiligt sind (Holm *et al.*, 2003; Hennion *et al.*, 1992). Die Lignifizierung dient zum einen als Schutzmechanismus gegen das Eindringen pathogener Mikroorganismen und zum anderen der Reduktion des Wasserverlusts.

Die zweite nach ihrer Lagerfähigkeit eingeteilte Gruppe der pflanzlichen Organe beinhaltet die Früchte. Diese dienen häufig dem Schutz der Samen sowie deren direkter oder indirekter Verbreitung z.B. durch das Anlocken von Tieren (Strasburger, 1999). Hinsichtlich der Lagerfähigkeit verhalten sich Früchte ähnlich den Organen aus Gruppe 1. Da auch Früchte in der Regel nicht zur Überdauerung konzipiert sind, sondern den oben beschriebenen zeitlich begrenzten Zweck erfüllen, verderben sie

nach der Ernte durch Wasserverlust und die nicht gegebene Fähigkeit zur Stoffwechselaufrechterhaltung (Nilsson, 2000). Veränderungen auf der Genexpressionsebene treten vor allem bei klimakterischen Früchten auf, deren Reifung erst nach der Ernte erfolgt. Eine entscheidende Rolle bei der klimakterischen Fruchtreifung spielt das Hormon Ethylen, dessen Produktion in der Synthesekaskade durch die Enzyme 1-Amino-Cyclopropan-1-Carboxylsäure-Synthetase (ACS) und 1-Amino-Cyclopropan-1-Carboxylsäure-Oxidase (ACO) reguliert wird. Bei Einsetzen der Fruchtreifung wird die Genexpression von ACS und ACO erhöht (Giovannoni, 2004). Die daraus resultierende erhöhte Synthese von Ethylen führt zu weiteren Änderungen des Genexpressionsmusters der reifenden Frucht (Alexander und Grierson, 2002).

In die dritte Gruppe der nach ihrer Lagerfähigkeit eingeteilten pflanzlichen Organe fallen Speicherorgane. Im Gegensatz zu den Gruppen 1 und 2 sind bei Pflanzen mit Speicherorganen die geernteten Organe zur Überdauerung in der natürlichen Umgebung konzipiert. Bei einjährigen Pflanzen dient das Speicherorgan häufig der vegetativen Vermehrung, wie z.B. die Sprossknolle der Kartoffel (*Solanum tuberosum*). Diese entwickelt sich aus Sprossausläufern (Stolonen) durch Verdickung an deren Enden (Strasburger, 1999). Nach der Überwinterung im Boden entstehen aus Sprossknospen, den so genannten Augen, unter Aufbrauchen der in Form von Stärke gespeicherten Kohlenhydratreserven neue Pflanzen.

Bei zweijährigen Pflanzen wie der Zuckerrübe wird das Speicherorgan als Energiereservoir genutzt, um nach der Überwinterung die generative Entwicklungsphase durch Blüten- und Samenbildung einzuleiten.

Die natürlichen Bedingungen der Überdauerung unterscheiden sich bei vielen Nutzpflanzen von den künstlich herbeigeführten Lagerungsbedingungen. Mit der Ernte geht häufig eine Verwundung einher, die zum Beispiel bei der Wurzelknolle des Manioks zum so genannten Post-harvest Physiological Deterioration (PPD) Syndrom führt. Die Verwundung ruft nach nur 15min einen oxidativen Ausbruch hervor, der zum vollständigen Verderb der Wurzelknolle innerhalb von 24-72 Stunden führt (Reilly *et al.*, 2004). Durch die gebildeten Sauerstoff- und Hydroxylradikale werden Membranen irreversibel geschädigt. Zudem liegt eine Veränderung im Genexpressionsmuster nach der Verwundung vor (Cortes *et al.*, 2002). Es werden Gene exprimiert, deren Translationsprodukte in den programmierten Zelltod involviert sind. Weiterhin wird die Expression von

Antioxidans-Genen wie Peroxidasen und Katalasen sowie von Pathogenabwehr-Genen wie der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) verstärkt. Die bisher wirksamste Möglichkeit, das PPD-Syndrom zu verhindern und so eine Verbesserung der Lagerungsfähigkeit von Maniok zu erreichen, ist der vollständige Ausschluss von Sauerstoff (Reilly *et al.*, 2004).

Demgegenüber geht die Ernte von Kartoffelknollen nicht mit einer direkten, offenen Verwundung einher und ist daher im Vergleich zum Maniok oder zur Zuckerrübe (Kapitel 1.3) schonend. Eventuelle Probleme in Form des Verderbs nach der Ernte treten durch Quetschungen auf (Edgell *et al.*, 1998). Veränderungen in der Qualität gelagerter Kartoffelknollen sind vor allem temperaturabhängig. Zu hohe Lagertemperaturen führen zur Auskeimung und somit zum Verbrauch der gespeicherten Stärke. Dieser Prozess kann durch niedrigere Temperaturen zwar verhindert werden, allerdings führen Temperaturen unter 10°C zum ungewünschten "cold-sweetening" (Coffin *et al.*, 1987; Li *et al.*, 2005). Dabei wird die gespeicherte Stärke invertasenvermittelt zu Glucose und Fructose hydrolysiert und die Kartoffel "versüßt".

Die Beispiele von Maniok und Kartoffel zeigen, dass pflanzliche Organe, die unter natürlichen Bedingungen zur Überdauerung konzipiert sind, sich nach der Ernte in ihrer Lagerfähigkeit unterscheiden. Während Maniok-Knollen nur unter Sauerstoffabschluss zu lagern sind, zeigen Kartoffel-Knollen in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen eine hohe Lagerfähigkeit. In beiden Fällen führen Änderungen auf Genexpressionsebene nach der Ernte zu Qualitätsveränderungen.

1.3 Stoffwechselphysiologische Effekte bei der Lagerung von Zuckerrüben

Das Speicherorgan der Zuckerrübe ist hinsichtlich der Lagerfähigkeit nach Nilsson (2000) in die dritte Gruppe pflanzlicher Organe einzuordnen.

Die maschinelle Ernte führt zu einer starken mechanischen Beanspruchung des Rübenkörpers in Form von Quetschungen (Wiltshire und Cobb, 2000) und durch das Abschneiden des Blattansatzes zu einer offenen Verwundung. Diese führt zu Wasserverlust und ermöglicht das Eindringen pathogener Erreger (Rosenkranz *et al.*, 2001). In diesem Zustand wird die Zuckerrübe in so genannten Mieten häufig auf dem Feld gelagert.

Aufgrund der fortschreitenden Zentralisierung der zuckerrübenverarbeitenden Industrie erhöhen sich die Lagerungszeiträume zunehmend. Daraus resultiert ein

wirtschaftlicher Schaden durch den Pro-Tag Verlust von 0,1% Saccharose in mietengelagerten Zuckerrüben (Jaggard *et al.*, 1997). Der Großteil des Zuckerverlusts ist durch Atmungsverluste zu erklären, das heißt, die Saccharose dient als Energielieferant für die ATP-Produktion in der oxidativen Phosphorylierung (van der Poel, 1998). Jaggard *et al.* (1997) detektierten einen ca. vierfachen Anstieg der Glucose- und Fructosekonzentration nach durchschnittlich 58 Tagen Lagerung. Der Anteil dieses nicht veratmeten Invertzuckers steigt somit um 10 bis 20 g pro Tonne und Tag an (Schiweck, 1970).

Der Energiebedarf zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels der geernteten Zuckerrübe wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Je schonender die Zuckerrüben geerntet werden, desto geringer sind die Saccharoseverluste während der Lagerung (Wiltshire und Cobb, 2000). Imura *et al.* (1986) haben gezeigt, dass eine viermonatige Lagerung handgeernteter Zuckerrüben zu lediglich 2% Saccharoseverlust führt, demgegenüber verlieren maschinell geerntete Zuckerrüben in der gleichen Lagerungszeit bis zu 19% Saccharose. Direkt nach der Ernte sind die Atmungsverluste am höchsten (Wyse und Peterson, 1979). Die Atmungsrate sinkt nach ca. 4 Tagen auf einen konstanten Wert ab. Rosenkranz *et al.* (2001) haben gezeigt, dass durch die Verwundung die Transkriptlevel einer zellwandständigen Invertase (CWI-1) und einer vakuolären Invertase (VI-1) ansteigen. Zu Beginn der Lagerung wird Energie benötigt, um die entstandenen Verwundungen durch Bildung eines Wundperiderms zu heilen (Kahl, 1978).

Die Lagerungsbedingungen selbst haben einen entscheidenden Einfluss auf die Qualitätsveränderungen während der Lagerung. Die optimale Temperatur, bei der die geringsten Qualitätsverluste entstehen, liegt zwischen +1 und +3°C (Wyse, 1978). Höhere Temperaturen haben eine Zunahme der Stoffwechselaktivität zur Folge (Vukov und Hangyal, 1985). Zudem begünstigen höhere Temperaturen mikrobielles Wachstum. Bei 25-30°C entwickeln sich eine Vielzahl bodenbürtiger Pilz- und Bakterienarten (van der Poel, 1998). Lagertemperaturen unter 0°C schränken mikrobielles Wachstum zwar effektiv ein, aber es besteht die Gefahr von Frostschäden. Einfrier- und Auftauzyklen zerstören die Zellmembranen und ermöglichen somit bei steigenden Temperaturen Pathogenbefall.

Der Befall gelagerter Zuckerrüben durch phytopathogene Erreger hat eine Zunahme der Atmungsrate zur Folge. Zu den hauptsächlichen Fäulniserregern nach der Ernte zählen die Pilzarten *Phoma betae*, *Penicillium claviforme*, *Fusarium culmorum* und

Botrytis cinerea (Bugbee, 1993). In Laborversuchen resultiert aus einer künstlichen Infektion mit den Gattungen *Penicillium* und *Botrytis* ein Anstieg der Atmungsrate um 100%, wenn 20% der Rübenoberfläche Pathogenbefall aufweisen (Mumford und Wyse, 1976). Zudem steigt der Invertzuckeranteil bei einer Infektionsfläche von 15% auf das Dreifache an. Bakterielle Infektionen hingegen sind von geringer Bedeutung. Sie treten allerdings bei unzureichender Durchlüftung in anaeroben Bereichen auf und führen zu fermentativen Prozessen. Durch diese kann es zu Temperaturerhöhungen auf bis zu 55°C in der Miete kommen (Bugbee, 1993). Die umliegenden aeroben Bereiche erwärmen sich ebenfalls und Pilzwachstum wird begünstigt.

Die so genannte technische Qualität der Zuckerrübe, welche die Menge an tatsächlich extrahierbarer Saccharose aus der Rübe beschreibt, wird zusätzlich noch durch weitere Faktoren beeinflusst (van der Poel 1998). Hohe Kalium-, Natrium- und vor allem α -Amino-N-Konzentrationen führen zu verstärkter Melassebildung (Buchholz *et al.*, 1995). Aus technischer Sicht stellt die Melasse den Ablauf der letzten Kristallisationsstufe der Saccharoseextraktion dar, aus dem kein Zucker mehr kristallisiert werden kann. Durch die Abnahme der Saccharosekonzentration während der Lagerung bei zumeist gleich bleibenden Natrium, Kalium und α -Amino-N-Konzentrationen wird das Konzentrationsverhältnis zur Seite dieser Melassebildner verschoben und somit der Ausbeuteverlust erhöht (Jaggard *et al.*, 1997).

Erhöhte Invertzuckerkonzentrationen wirken sich ebenfalls negativ auf die Saccharoseextraktion aus (Jaggard *et al.*, 1999). Folgeprodukte der Reaktionen von Glucose und Fructose mit α -Amino-N-Verbindungen können zur Verfärbung der Extraktionslösung führen und verringern so die Ausbeute an weißem Kristallzucker (van der Poel, 1998). Weitere Abbauprodukte des Invertzuckers sind Carbonsäuren wie Ameisen- und Essigsäure, welche die Extraktionslösung ansäuern und somit die Saccharosehydrolyse fördern (Jaggard *et al.*, 1999).

Das aus biologischer Sicht zur Überdauerung im Boden konzipierte Speicherorgan der Zuckerrübe ist auch nach der Ernte bei geeigneten Umweltbedingungen über mehrere Monate lagerfähig (van der Poel, 1998). Jedoch liegen immer Ausbeuteverluste hinsichtlich der zu extrahierenden Saccharose vor. Ein Teil der Verluste kann durch Optimierung der Lagerungsbedingungen minimiert werden. Allerdings sind Probleme wie die Akkumulation von Invertzuckern im Laufe der Lagerung kaum über die Änderung der Umgebungsbedingungen lösbar. Daher ist

das Verständnis von Stoffwechselvorgängen während der Lagerung, die direkten oder indirekten Einfluss auf Zuckergehalt oder -qualität haben, essentiell für eine Optimierung von Kultivierungs- und Verarbeitungsbedingungen. So könnten auf biotechnologischem Weg die Lagerungseigenschaften von Zuckerrüben verbessert werden. Denkbar wäre beispielsweise die Inhibierung saccharoseabbauender Enzyme, um die lagerungsbedingte Invertzuckerakkumulation zu minimieren.

1.4 Saccharoseabbauende Enzyme der Zuckerrübe

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, führt die Lagerung von Zuckerrüben zu einer Akkumulation nicht veratmeter Invertzucker (Schiweck, 1970; Jaggard *et al.*, 1997). Die Invertzuckerbildung aus der gespeicherten Saccharose wird von zwei Enzymklassen katalysiert (Berghall *et al.*, 1996). Die Saccharose-Synthase (SuSy), von der in *Beta vulgaris* die zwei Isoformen SBSS1 und SBSS2 bekannt sind, setzt Saccharose unter Verwendung des Co-Substrats Uridindiphosphat (UDP) reversibel zu UDP-Glucose und Fructose um (Hesse und Willmitzer, 1996). Demgegenüber katalysieren Invertasen die irreversible hydrolytische Spaltung von Saccharose zu Glucose und Fructose (van der Poel, 1998). Es werden nach Roitsch und Gonzalez (2004) drei Klassen unterschieden: ionisch zellwandgebundene saure Invertasen (Inv-CW), vakuoläre saure Invertasen (Inv-V) und cytoplasmatische neutrale Invertasen (Inv-N). Während vakuoläre und zellwandständige Invertasen zur Enzymklasse der β -Fructofuranosidasen zählen und neben Saccharose auch andere β -Fructose-haltige Oligosaccharide als Substrat akzeptieren, sind cytoplasmatische Invertasen saccharosespezifisch.

In der Zuckerrübe werden nach Rosenkranz *et al.* (2001) zwei zellwandständige (CWI-1/2) und zwei vakuoläre Isoformen (VI-1/2) unterschieden, von denen jeweils eine Isoform (CWI-1 und VI-1) wundinduziert ist. Bisher wurde nur ein Gen einer cytoplasmatischen Invertase aus *Beta vulgaris* isoliert (Gonzalez, unveröffentlicht, GenBank Acc. Nr. AJ422050). Wyse (1974) konnte zeigen, dass während der Lagerung von Zuckerrüben ein Rückgang der SuSy- und der Inv-N-Aktivität zu verzeichnen ist. Die Aktivität saurer Invertasen stieg jedoch an, womit erstmals ein Zusammenhang zwischen saurer Invertase-Aktivität und Invertzucker-Akkumulation während der Lagerung postuliert wurde. Berghall *et al.* (1996) bestätigten diese Annahme. Es wurde gezeigt, dass die Gesamt-Invertase-Aktivität im Laufe der

Lagerung sinkt, die Aktivität saurer Invertasen, bei gleichzeitiger Akkumulation von Invertzuckern, aber ansteigt.

Rosenkranz *et al.* (2001) haben gezeigt, dass die Transkription der zellwandständigen sauren Invertase CWI-1 bereits 10 Stunden nach der Ernte induziert wird. Diese frühe Induktion lässt vermuten, dass CWI-1 eine entscheidende Rolle in der Mobilisierung von Saccharose zu Beginn der Wundverschlussreaktionen spielt. Die Transkription der vakuolären Invertase VI-1 hingegen erfolgt erst 2 Tage nach der Ernte und verbleibt auch nach 15 Tagen Lagerung auf einem hohen Level. Nach Untersuchungen von Wyse und Peterson (1979) fällt aber die Atmungsrate innerhalb von 4 Tagen nach der Ernte auf ein niedriges Niveau ab, das heißt, die Wundverschlussreaktionen sind vermutlich abgeschlossen und es bedarf einer geringeren Menge an Invertzuckern, um den Stoffwechsel aufrecht zu erhalten. Die Invertase VI-1 mobilisiert zwar die in der Vakuole gespeicherte Saccharose auch im Zeitraum der stattfindenden Wundverschlussreaktionen, aufgrund der gleich bleibend hohen Transkriptionsaktivität während der Lagerung wird allerdings nicht veratmeter Invertzucker akkumuliert. Im Kontext dieser Ergebnisse verweisen Rosenkranz *et al.* (2001) auf die wundinduzierte vakuoläre saure Invertase VI-1 als geeignetes Zielgen zur biotechnologischen Minimierung der lagerungsbedingten Invertzuckerakkumulation. Diesbezüglich kommen mehrere Konzepte in Frage, die als generelles Ziel die Aktivitätsreduktion der Invertase VI-1 vorsehen.

1.5 Biotechnologische Reduktion der lagerungsbedingten Invertzuckerakkumulation

Zu den klassischen Strategien zählt die posttranskriptionelle Beeinflussung der Genexpression durch Antisense-RNA-Moleküle. Dieser RNA-Interferenz-(RNAi)-Mechanismus stellt eine Möglichkeit zur posttranskriptionellen Beeinflussung der VI-1-Genexpression dar. Das RNAi-Phänomen ist in Pflanzen als so genannte Co-Suppression oder posttranskriptionelles Gene-Silencing (PTGS) bekannt (van der Krol *et al.* 1990; Jorgensen, 1990; Hamilton und Baulcombe, 1999). Das Silencing des Zielgens wird über komplementäre doppelsträngige RNA-Moleküle realisiert. Diese werden mittels des Enzyms Dicer, welches eine dsRNA-Spezifität aufweist und der RNase III-Familie angehört, zu kleinen doppelsträngigen RNA-Fragmenten, den small interfering RNAs (siRNA), gespalten. Diese siRNAs werden in einen nukleasehaltigen Komplex, den so genannten RISC (RNA induced silencing

complex), integriert. Aufgrund der Komplementarität zwischen siRNAs und Zieltranskript wird der RISC-Komplex an die Ziel-mRNA herangeführt und degradiert selbige durch die vorhandene Nukleasefunktion.

Eine weitere anwendbare Strategie sieht die posttranslationale Inhibierung durch endo- oder exogene Invertaseinhibitoren vor (Rausch und Greiner, 2004). Diese sind indirekt an der Regulation des zellulären Hexose/Saccharose Konzentrationsverhältnisses beteiligt. Da Zucker auch als Signalmoleküle fungieren (Wobus und Weber, 1999), ist häufig eine schnelle Regulation von Invertasen erforderlich, um das Hexose/Saccharose Verhältnis anzupassen. Invertasen sind aufgrund ihres Glycosylierungsmusters sehr stabil und folglich ist außer der transkriptionellen auch eine posttranslationale Regulation unter anderem über Invertaseinhibitoren notwendig (Rausch und Greiner, 2004). In *Nicotiana tabacum* wie auch in *Arabidopsis thaliana* wurden sowohl Inhibitoren zellwandständiger, als auch vakuolärer Invertasen beschrieben (Greiner *et al.*, 1998; Link *et al.*, 2004). Es konnte bereits bei Kartoffelknollen gezeigt werden, dass die Überexpression des vakuolären Tabak-Invertaseinhibitors zur Reduktion des ungewünschten 'cold sweetening' führt (Greiner *et al.*, 1999).

Die Anwendbarkeit der genannten Strategien zur Reduktion der Invertase-Aktivität muss experimentell analysiert werden. Grundlage aller Systeme sollte eine bedarfsgerechte Genexpression von Antisense-, RNAi- oder Inhibitor-Konstrukten nach der Ernte in gelagerten Zuckerrüben sein. Die konstitutive Inhibierung von *Beta vulgaris* Invertasen stellt insofern keine Option dar, da Invertasen im Zuge der gesamten Zuckerrübenentwicklung Aktivität aufweisen und vermutlich essentiell sind (Berghall *et al.*, 1996). In jungen Wurzeln wurden hohe Invertase-Aktivitäten und hohe Invertzuckerkonzentrationen detektiert, die jeweils bis zum Erntezeitpunkt auf ein Minimum absinken. Diese Ergebnisse deuten auf eine entwicklungsabhängige Regulation der Invertasen hin, deren Störung erst nach erfolgter Ernte indiziert ist. Zu diesem Zweck werden Genpromotoren benötigt, die nach der Ernte eine gezielte Expression z.B. im parenchymatischen Gewebe der Zuckerrübe, dem Ort der höchsten Saccharosekonzentration, vermitteln. Die Bedeutung der regulierten Expression wird durch die Arbeiten von Tang *et al.* (1999) ersichtlich, die durch konstitutive Expression von Invertase- (Inv-V und Inv-CW) sowie SuSy-Antisense-Konstrukten die Expression der zugehörigen Zielgene in der Karotte inhibieren konnten. Die konstitutive Inhibierung führte in allen Fällen zu einer abnormen

Entwicklung des Speicherorgans der Karotte. Die transgenen Antisense-Pflanzen erzeugten deutlich kleinere Wurzelrüben als die Kontrollpflanzen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit, Promotoren zur Verfügung zu haben, die eine Transgenexpression zu einer bestimmten Zeit in einem definierten Gewebe vermitteln (Sturm und Tang, 1999).

Die Regulation eines eingebrachten Transgens wird durch mehrere Faktoren beeinflusst (Pedersen *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang am bedeutendsten ist die transkriptionelle Regulation über *cis*-regulatorische Elemente im Promotorbereich (Potenza *et al.*, 2004). Der Promotorbereich ist in der Regel upstream des Transkriptionsstartpunktes (TSS) des zugehörigen Gens lokalisiert (Rombauts *et al.*, 2003). Zu den weiteren die Genexpression beeinflussenden Faktoren zählen der Acetylierungs- und Methylierungsgrad des Chromatins (Lusser, 2002), die Transkriptionsinitiation (Roeder, 1996), die pre-mRNA-Prozessierung zu mRNA (Akker *et al.*, 2001), deren Stabilität (Staton *et al.*, 2000) und schließlich die Translationsinitiation (Kawaguchi und Bailey-Serres, 2005) sowie posttranslationale Modifikationen des Proteins.

In der Zuckerrübe sind nur wenige spezifisch regulierte Promotoren bekannt. In einem zur vorliegenden Arbeit vergleichbaren Ansatz wurden von Kloos *et al.* (2002) über ein Suppression Subtractive Hybridization (SSH) Experiment wurzelrübenspezifische Gene isoliert. Oltmanns (2005) hat von drei Genen (*BvMII*, *BvTlp*, *BvHis1-r*) die Promotoren isoliert und deren Spezifität über Reportergerganalysen in der Zuckerrübe und in Tabak untersucht. Herauszustellen ist hier vor allem der Promotor des *BvMII*-Gens, codierend für ein Major-latex-like Protein, der eine starke Expression in allen Geweben der Wurzelrübe vermittelt.

Von Stahl *et al.* (2004) wurden über ein SSH-Experiment blattspezifische Gene der Zuckerrübe isoliert. Die Blattspezifität der Promotoren von *Bvcab11* und *Bvcab12*, jeweils codierend für Chlorophyll a/b binding Proteine, wurde über Reportergerganalysen bestätigt.

Neben diesen gewebespezifischen Promotoren sind auch pathogenregulierte Promotoren bei Zuckerrüben analysiert worden. Schmidt *et al.* (2004) haben eine Repression des *BvPAL*-Promotors, der das Phenylalanin-Ammonium-Lyase Gen reguliert, nach einer Pilz-Infektion mit *Cercospora beticola* nachgewiesen. Thureau *et al.* (2003) haben über Reportergerganalysen die Induktion des Nematoden-

Resistenzgen Promotors Hs1^{pro-1} nach Infektion mit dem Rübenzystennematoden *Heterodera schachtii* gezeigt.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Das Verständnis der Nach-Ernte induzierten Genexpression bei Zuckerrüben steht im Vordergrund dieser Arbeit. Es stellt sich die Frage, inwieweit die Genexpression durch den Ernteprozess und die anschließende Lagerung beeinflusst wird. Zur Beantwortung dieser Frage dient die Analyse der Expressionskinetik Nach-Ernte induzierter Gene während der Lagerung sowie die Funktionsaufklärung der in ihrer Expression veränderten Gene. Anhand von Sequenzhomologien und den ermittelten Expressionsdaten werden Hypothesen zu den Genfunktionen aufgestellt. Die Überexpression einiger Gene im heterologen System *Arabidopsis thaliana* trägt zur Klärung der Funktion bei.

Außerdem erfolgt die Genexpressionsanalyse unter dem Aspekt einen Promotor zu identifizieren, der vornehmlich in den Geweben der Wurzelrübe nach der Ernte aktiv ist. Der biotechnologische Einsatz eines solchen Promotors zielt auf die Erzeugung transgener Pflanzen ab, deren Lagerungseigenschaften durch die spezifische Expression eines Transgens nach der Ernte verbessert werden. Mithilfe bioinformatischer Analysen soll geklärt werden, ob gemeinsame *cis*-regulatorische Elemente in Nach-Ernte induzierbaren Promotoren existieren, die möglicherweise entscheidenden Einfluss auf eine beobachtete Nach-Ernte Induktion haben.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Enzyme

Im Zuge der Arbeit wurden Chemikalien und Verbrauchsmaterialien der Firmen Amersham Bioscience, Applichem, BD Bioscience, BioRad, Duchefa, Fluka, Merck, Sigma und Roth verwendet. Radiochemikalien wurden von der Firma Hartmann Analytik (Braunschweig) geliefert. Restriktions- und weitere DNA-modifizierende Enzyme sind von der Firmen BD Bioscience, Fermentas, Invitrogen, New England Biolabs und Qbiogene bezogen worden. Ausnahmen werden gesondert aufgeführt.

2.2 Kits

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Katalog #</u>
NucleoSpin [®] Plasmid	Macherey-Nagel	740588.250
NucleoBond [®] AX-100	Macherey-Nagel	740573.100
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen	27106
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen	28106
QIAquick [®] Nucleotide Removal Kit	Qiagen	28304
Oligotex [™] mRNA Mini Kit	Qiagen	70022
Oligotex [™] mRNA Midi Kit	Qiagen	70042
Lambda Midi Kit	Qiagen	12543
HexaLabel [™] DNA Labeling Kit	Fermentas	70042
TA Cloning [®] Kit	Invitrogen	K2000-J10
SuperScript [™] Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning	Invitrogen	18248-013
ElectroMAX [™] DH10B [™] Competent Cells	Invitrogen	18290-015
NucleoSpin [®] RNA Plant	Macherey-Nagel	740949.50
RevertAid [™] First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas	K1622
Marathon [™] cDNA Amplification Kit	Clontech	K1802-1

2.3 Plasmide

<u>Plasmide</u>	<u>Anwendung/Eigenschaft</u>	<u>Referenz/Bezugsquelle</u>
pBluescript SK+ (pBSK)	Klonierung	Stratagene
pBluescript KS+ (pBKS)	Klonierung	Stratagene
pCR [®] 2.1	TA-Klonierung, Klonierung	Invitrogen
pCMV•SPORT6	Klonierung	Invitrogen

<u>Plasmide</u>	<u>Anwendung/Eigenschaft</u>	<u>Referenz/Bezugsquelle</u>
pSPORT1	cDNA-Bank-Erstellung	Invitrogen
pVKH-35S-pA1	T-DNA-Vektor	Reintanz <i>et al.</i> (2002)
p1xW1-luc-kan	T-DNA-Vektor	Dietmar Stahl, Planta GmbH Einbeck; pers. Mitteilung

2.4 Genomische Zuckerrübenbank

Im Rahmen der Arbeit wurde eine genomische Lambda-Phagen Bank der Zuckerrübe vorliegend im EMBL3 SP6/T7 Vektor (Clontech) verwendet (Stahl *et al.*, 2004).

2.5 Bakterienstämme

<u><i>Escherichia coli</i></u>	<u>Genotyp</u>	<u>Bezugsquelle</u>
XL1-Blue MRF'	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac F' [proAB⁺ lac^f lacZΔ M15 Tn 10(tetr)]</i>	Stratagene
INVαF'	<i>F' endA1 recA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) supE44 thi-1gyrA96 relA1φ80 lacZΔ M15Δ (lacZYA- argF),U169 λ</i>	Invitrogen
EMDH10B TM	<i>F- mcrAΔ (mrr- hsdRMS- mcrBC) φ80d lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu)7697 gal U gal K λ- rpsL nupG</i>	Invitrogen
XL1-Blue MRA	<i>Δ(mcrA) 183Δ (mcrCB-hsd SMR-mrr), 173, end A1, supE44, thi-1, gyrA96, tellA1, lac, [F'proAB, lac^qZM15, Tn10 (tet^r)]</i>	Stratagene
<u><i>Agrobacterium tumefaciens</i></u>	<u>Referenz</u>	
C58C1[pGV2260]	Deblaere <i>et al.</i> (1985)	
GV3101[pMP90]	Koncz und Schell (1986)	

2.6 Pflanzenlinien

Arabidopsis thaliana, Ökotyp Columbia (Col-0)

Beta vulgaris L. ssp. *vulgaris* var. *altissima*, Genotyp 1K0088 (D. Stahl, pers. Mitteilung).

2.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Herstellern MWG Biotech und Invitrogen bezogen. Alle Oligonukleotide wurden anhand selbst isolierter Sequenzen konzipiert, mit Ausnahme der GAPDH-Gen-Sequenz (de Los Reyes *et al.*, nicht veröffentlicht, GenBank Acc. Nr. AW697769).

Tabelle 1: Primer für die semiquantitative RT-PCR zur Aufnahme der Expressionsprofile Nach-Ernte induzierter Gene der Zuckerrübe.

Primername	5' → 3' Sequenz
SSH-4-Left	ATTGATGTGTTGTCAAGTTGTTGTT
SSH-4-Right	AACATCATATGAAAGTTTGGCACTT
SSH-7-Left	TTCCAAGAAGACAATGGAGATTAAAC
SSH-7-Right	AAAGGAACAACCTTAATCAACTTCC
SSH-20-Left	GACTCCAATTCTAGCCATCTTGAC
SSH-20-Right	AATGAAACATTCCCTTGATCAAACCTC
SSH-132-Left	AAAACCTTTGCAAAATTTAAAATCA
SSH-132-Right	TGAGAGTTGTCAAGGAGTAAAATGA
SSH-145-Left	AATCAGCAGGCTGTGAGTGTATAAT
SSH-145-Right	CTCCAGAGATTATGCCTTCTATCAA
SSH-153-Left	AAGTTTCTTAACAAGACTCCGCAAT
SSH-153-Right	TGAGTCCCAATACAATGTTATTCCT
SSH-193-Left	CCAAAGATTCTCTTCAATTTCTTCA
SSH-193-Right	GGGATATTATGATTTTCCACCTA
SSH-220-Left	ACATGCTTCAAGTCTACAACTAAACT
SSH-220-Right	TTCTCCAAAGATATATGGAAGTTACG
SSH-227-Left	CTTAAGTAGCTGACAAGCATCAACC
SSH-227-Right	TTTCTTTGGAAGAGAGATTTGTTTG
SSH-254-Left	CACAGAGAAAGTAACCAAAGACACC
SSH-254-Right	TAATTTTCAATGAGGAGAAATCCTG
SSH-266-Left	ATGTAAGATTATCACCAGGAGCAAC
SSH-266-Right	CTGTCATGGAAC TACAAC TATGCTC
SSH-288-Left	CTTATTCTCCGTCAATGGTTTTATG
SSH-288-Right	ACAATCTCTTGAATCTTCCTCTTCA
SSH-292-Left	AAGATAGCCCTCCAAATATAAATCG
SSH-292-Right	TGAACCTGAATCTGTAACTGCTGA
SSH-296-Left	ACTGTATGCTAAGGCTGTGAAATTG
SSH-296-Right	TTGTGTTTCAATTCTGCTTTTCAGATA
SSH-333-Left	TTCTTAACATAGACAAGAACATTTGC
SSH-333-Right	AATATATGGTTATTTGGTCCCCTTT
SSH-334-Left	ATAAAGGCTGGATGGAGAACTGTAG

Fortsetzung Tabelle 1:

SSH-334-Right	ACGAGAAACACCCCTCTTAAGTAAT
Bv-GAPDH-Left	ATGTTTAAGTACGACAGTGTTCACG
Bv-GAPDH-Right	ATGTGAAGGTCTGACTTGTATTTCGT

Tabelle 2: Primer zur Sequenzierung der isolierten cDNA-Klone Nach-Ernte induzierter Gene.

Primernamen	5' → 3' Sequenz
M13 rev	GGAAACAGCTATGACCATGATTAC
M13 forward	TTGTAAACGACGGCCAGTGA
T7 Primer	TGTAATACGACTCACTATAGGGC
7.7-5'	AGAAGAAGGCATCCTTTGAAAAC
145.3r1	TTATTGTTTTGGTAAAGAGCTTGTG
153.6r1	CACGGTTTAAATTTATGGAGCAG
220.1r1	GACACTTTGGACGATTCTATTTCAC
220.1r2	CATATTGTGAAGTCCATGAAAGAA
254.5r1	TCATGGTTACAACAAGGGTACTG
266.1r1	AACTGTCATGGAACAACAATATGC
288.2r1	TTGGTGATGACCTTGTGTGTTAC
288.2r2	GGGGTCAAGGATAAGATAATGAAG
292.7r1	AAATAAGCCTTGGAATTTATGAGC
292.7r2	GATTTGCATTGTGTTATTCATGCT
296.8r1	CTTGGGTTTATCTCATAGCTTGTC
296.8r2	GAACCTGTTGGTGCTCGTCTAAT
296.8r3	GCTAAGGGAAAACCACAAATAGAA
333.1r1	CTAAAGATGGGATGTTGTATACCG
333.1r2	ATTAACCTCTATTGTGGTGGGCTTT
333.1r3RC	ATACAATTTTTGTTGCATGTTTTCA
333.1r4RC	TGCTCAACGGCTAAACACTTAAC
333.1r5RC	AAACACAACACTGCCAACTTATG
334.6r1	ACTGCTTTTGGCTTTAGCTATTTT

Tabelle 3: Zur 5'-RACE-Amplifikation verwendeter genspezifischer Primer.

Oligonukleotid-Bezeichnung	5' → 3' Sequenz
193.1RACE5'	CTGATGCTCGGTGTGAGTGAATCGGAAC

Tabelle 4: Zur Prüfung auf Transgenexpression in transgenen *A. thaliana* Linien verwendeter genspezifischer Primer.

Oligonukleotid-Bezeichnung	5' → 3' Sequenz
132.1-5'	TCTACGTATTTGCAACAAAACAAA

Tabelle 5: Zur Isolierung der Promotorbereiche von vier Nach-Ernte induzierten Genen als Hybridisierungs sonden eingesetzte Oligonukleotide.

Oligonukleotid-Bezeichnung	5' → 3' Sequenz
7-G2-5'	TTAACGAAGCTGAGATACTCTGGAA
20.3-5'	TCATTTTCCTTTGTTCTTTTCTTG
153.6-5'	AAGAAAAATATGAAGGCATTGACAG
227.5-5'	AGTTTTCATTTGTTGGGTTTAAAGG

Tabelle 6: Zur Erstellung von Promotor-Luciferasekonstrukten von vier Nach-Ernte induzierbaren Promotoren verwendete Primer.

Primername	5' → 3' Sequenz
7- <i>Nco</i> I-Primer	gcatccatgGATGCACCTTCAGAAAAAATAACCTAG
7- <i>Mlu</i> I-Primer	gcatgtcgacAAACGCGTCGTTTCCTCACAAC
20- <i>Nco</i> I-Primer	gcatccatggTCTATATATGCAAACTTGCTATAAGAATC
20- <i>Sna</i> BI-Primer	ATGCTACGTAGATTTAGAAAAGTCATACAC
153- <i>Nco</i> I-Primer	gcatccatggTTTCTTGTCACACTAATGCATCTGTATC
153- <i>Bsp</i> 120I-Primer	ATATGGGCCCGGACGATGCTCCG
227- <i>Nco</i> I-Primer	gcatccaTGGATGTATTCAATGAATGAATGATAAG
227- <i>Pag</i> I-Primer	gcatgtcgaCCTTCATGACGTGTCCTATCACAATC

2.8 Pflanzenmaterial

Das gesamte *Beta vulgaris* Pflanzenmaterial wurde von Dietmar Stahl (Planta GmbH Einbeck) zur Verfügung gestellt.

2.8.1 Pflanzenmaterial aus kontrolliert gelagerten Zuckerrüben

Die Zuckerrüben wurden nach 26 Wochen Wachstum manuell geerntet. Nach Abschneiden des Blattansatzes wurden die Rüben zur Simulation agronomisch relevanter Ernte- und Verarbeitungsbedingungen im Betonmischer maschinell beansprucht. Die Zuckerrüben wurden in Säcken bei einer Temperatur von 17°C und eine weitere Stichprobe bei einer erhöhten Temperatur von 26°C/28°C eingelagert. Nach entsprechenden Lagerungszeiten wurden die Zuckerrüben zu Rübenschnitzeln (1-2 cm³) verarbeitet und bei -70°C aufbewahrt. In Tabelle 7 sind die Lagerungszeiträume aufgeführt. Als ungelagerte Referenzprobe wurden Zuckerrüben nach Entfernen der Blätter direkt zu Rübenschnitzeln verarbeitet und bei -70°C aufbewahrt (D. Stahl, pers. Mitteilung). Die Zuckerrüben-Blätter wurden ebenfalls bei -70°C bis zur Verarbeitung gelagert.

Tabelle 7: Lagerungsdauer (in Tagen) und Temperatur (in °C) der unter kontrollierten Bedingungen eingelagerten Zuckerrüben.

Lagerungszeit [Tage]	1	3	4	7	14	21	28	35	46
Temperatur [°C]	17 + 28	17 + 28	17 + 26	17 + 26	17 + 26	17	17	17	17

2.8.2 Pflanzenmaterial aus der Feldmiete

Um Material von Zuckerrüben zu untersuchen, die unter agronomisch relevanten Bedingungen gelagert wurden, sind Stichproben aus einer Feldmiete entnommen worden (D. Stahl, pers. Mitteilung). Die Zuckerrüben sind maschinell geerntet und anschließend feldgelagert worden. Nach den entsprechenden Lagerungszeiten, die in Tabelle 8 wiedergegeben sind, wurden die Rübenkörper zu Rübenschnitzeln zerkleinert und bis zur Weiterverarbeitung im Labor bei -70°C aufbewahrt.

Tabelle 8: Lagerungszeit (in Tagen) feldgelagerter Zuckerrüben (Miete).

Lagerungszeit [Tage]	0	1	3	6	10	14	21	28	35	42	49
----------------------	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----

2.8.3 Gewebeproben aus Zuckerrüben in der Wachstumsphase

Um die Genexpression während der Zuckerrübenentwicklung verfolgen zu können, wurden heranwachsende Zuckerrüben zu bestimmten Zeitpunkten geerntet und mittelgroße Blätter, die Blattstiele sowie zerkleinertes Material der Wurzelrübe getrennt voneinander tiefgefroren bei -70°C aufbewahrt (D. Stahl, pers. Mitteilung). In Tabelle 9 sind die Zeitpunkte nach der Aussaat in Wochen [Wo] und die geernteten Organe aufgeführt.

Tabelle 9: Zu bestimmten Zeitpunkten, angegeben in Wochen [Wo], geerntetes Pflanzenmaterial aus heranwachsenden Zuckerrüben. B=mittlere Blätter, P=Petiole, W=Wurzelrübe.

Organ	W	W	B	P	W	B	P	W	B	P	W	B	P	W	B	P	W
Alter [Wo]	4	6	8	8	8	13	13	13	17	17	17	21	21	21	25	25	25

2.9 RNA-Material aus Zuckerrüben

Im Rahmen der Arbeit wurde mit bereits isolierter Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial der Kapitel 2.8.1 - 2.8.3 gearbeitet. Aus allen in Tabelle 7 (Kapitel 2.8.1) und Tabelle 8 (Kapitel 2.8.2) aufgeführten Proben sowie aus ungelagerten Zuckerrüben und Blattmaterial (Kapitel 2.8.1) wurde Gesamt-RNA von Dorothee Kloos (TU

Braunschweig) isoliert. Aus allen in Tabelle 9 (Kapitel 2.8.3) aufgeführten Proben wurde Gesamt-RNA von Dietmar Stahl (Planta GmbH, Einbeck) isoliert.

2.10 Genetisches Material einer Forward- und einer Reverse-Subtraktion

Die vorliegende Arbeit basiert auf zwei Suppression Subtractive Hybridization (SSH) Experimenten (Diatchenko *et al.*, 1996) durchgeführt mittels des "CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit" (Clontech) gemäß Herstellerangaben (Kloos und Hehl, pers. Mitteilung).

Forward-Subtraktion: Subtraktion einer cDNA-Mischpopulation 1-46 Tage gelagerter Zuckerrüben bei 17°C und 28/26°C (Tabelle 7) gegen cDNA ungelagerter Zuckerrüben (Kapitel 2.8.1).

Reverse-Subtraktion: Subtraktion von cDNA ungelagerter Zuckerrüben (Kapitel 2.8.1) gegen eine cDNA-Mischpopulation 1-46 Tage bei 17°C und 28/26°C gelagerter Zuckerrüben (Tabelle 7).

2.11 SSH-Fragmente Nach-Ernte induzierter Gene

Im Rahmen meiner Diplomarbeit (Alexander Rotthues, TU Braunschweig) sind die aus der Forward-Subtraktion (Kapitel 2.10) erhaltenen cDNA-Fragmente in den pCR®2.1 Vektor *via* TA-Klonierung subkloniert worden. Über differentielle Hybridisierungen sind 16 Nach-Ernte induzierte Gene, repräsentiert durch die zugehörigen SSH-cDNA-Namen, identifiziert worden. In Tabelle 10 sind diese Namen der SSH-Fragmente, deren Länge und die anhand der vorliegenden Sequenzinformation ableitbaren Homologien aufgeführt. Anhand der SSH-Fragmentsequenzen können nicht allen Genen Homologien zugewiesen werden. Dies erfolgte über cDNA-Sequenzen und Homologievergleiche der ableitbaren Translationsprodukte (Kapitel 3.1.1). Die in Tabelle 10 aufgeführten Gen-Namen leiten sich somit aus der Homologie des zugehörigen cDNA-Translationsprodukts ab. Im Falle der SSH-Fragmente 4, 227 und 334 konnten auch anhand der cDNAs keine Proteinhomologien detektiert werden, so dass die Gene mit dem Kürzel *NPCG* für "Non Proteincoding Gene" bezeichnet wurden. Weiterhin sind in Tabelle 10 die definierten Amplifikatlängen aufgeführt, welche nach Durchführung einer PCR mit den in Tabelle 1 (Kapitel 2.7) aufgelisteten spezifischen SSH-Primern resultieren.

Tabelle 10: SSH-Fragmente Nach-Ernte induzierter Gene unter Angabe der SSH-Namen, -Längen und -Homologien auf Nukleotidebene. Weiterhin sind die Gen-Namen und die PCR-Amplifikatlängen unter Verwendung der in Tabelle 1 aufgeführten spezifischen SSH-Primer wiedergegeben.

SSH-Name	Gen-Name	SSH-Länge [bp]	SSH-Homologie Nukleotidebene; GenBank Acc. Nr.	Amplifikat [bp] SSH-Primer
4	<i>BvNPCG1</i>	295	-	211
7	<i>BvHSP83</i>	423	<i>Pharbitis nil</i> heat shock protein 83 (Hsp83); M99431	307
20	<i>BvCPRX1</i>	356	<i>Spinacia oleracea</i> mRNA for peroxidase; Y10463	216
132	<i>BvPSK</i>	317	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> putative phytosulfokine peptide precursor (PSK1); BK000124	228
145	<i>BvB12D</i>	366	-	216
153	<i>BvRIP-r1</i>	1063	<i>Spinacia oleracea</i> mRNA for ribosome-inactivating protein; AB070925	357
193	<i>BvGLP-r</i>	440	<i>Beta vulgaris</i> germin-like protein Kiel 1 (GLP-Ki1); AY232455	212
220	<i>BvC561R</i>	239	-	180
227	<i>BvNPCG2</i>	428	-	404
254	<i>BvBPM1</i>	485	<i>Beta vulgaris</i> plasma membrane major intrinsic protein 1; U60147	298
266	<i>BvSP2</i>	394	<i>Beta vulgaris</i> chitinase (SP2); L25826	289
288	<i>BvRCC</i>	798	-	406
292	<i>BvRIP-r2</i>	326	-	215
296	<i>BvMARB</i>	359	<i>Arabidopsis thaliana</i> putative SAR DNA-binding protein; AY096684	239
333	<i>BvWDRP</i>	319	-	204
334	<i>BvNPCG3</i>	526	-	404

2.12 Molekularbiologische Methoden

Allgemeine Techniken, wie die Kultivierung von *E. coli* und *A. tumefaciens*, Herstellung elektrokompeter Zellen, Transformation durch Elektroporation, bakterielle Plasmidisolierung, Isolierung von Lambda-Phagen-DNA sowie das Auftrennen von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese sind wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben, durchgeführt worden. Die Verwendung von DNA-modifizierenden Enzymen und Kits erfolgte gemäß Herstellerangaben.

Sequenzierungen sind extern bei den Firmen Seqlab GmbH (Göttingen) sowie Agowa GmbH (Berlin) in Auftrag gegeben worden. Das Sequenzierungsverfahren erfolgte nach der bei Sanger *et al.* (1977) beschriebenen dideoxyvermittelten Kettenabbruchmethode.

Die Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) führte radioaktive 5'-Endmarkierungen von DNA-Oligonukleotiden durch.

2.13 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung erfolgte nach der so genannten 'freeze and squeeze' Methode (Radke, 2004). Zunächst wurde das aufzureinigende DNA-Fragment agarosegelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Exzision der Bande erfolgte mit einer sauberen Skalpell-Klinge. Nach mechanischer Zerkleinerung des Agaroseblocks in einem Eppendorf-Gefäß, Übersichtung mit 1 Volumen Phenol und 15-minütiger Zentrifugation bei 20000xg wurde die Oberphase in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und einer Phenol/Chloroform Extraktion unterzogen. Die Oberphase wurde erneut abgenommen, die DNA mit Ethanol/NaOAc gefällt, zentrifugiert und das Pellet in LTE-Puffer resuspendiert.

2.14 Arbeiten mit RNA

Zur Inhibierung von RNasen wurden alle wässrigen Lösungen mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, geschüttelt, über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert (121°C, 1bar, 20min). Substanzen, die nicht mit DEPC behandelt werden können (z.B. Tris-Puffer), wurden kommerziell mit dem Zusatz "RNase-frei" erworben.

Glasgefäße wurden durch vierstündiges Backen bei 180°C sterilisiert, Pipettenspitzen und Eppendorfgefäße durch 40minütiges Autoklavieren. Weiterhin wurden Arbeitsbänke und -gegenstände (Pipetten, Pinzetten etc.) durch Behandlung mit RNaseAway™ (Molecular BioProducts) von potentiellen RNase-Kontaminationen befreit. Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders beschrieben, gekühlt auf Eis durchgeführt.

2.14.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben mittels des "NucleoSpin® RNA Plant Kits" (Macherey-Nagel). Es wurde ca. 100mg *A. thaliana* Blattmaterial eingesetzt. Nach Durchlaufen des Protokolls ist die RNA in 60µl ddH₂O aufgenommen und bei -70°C gelagert worden.

2.14.2 Isolierung von PolyA+ mRNA

Aus extrahierter Gesamt-RNA gelagerter Zuckerrüben (Kapitel 2.9) wurde mittels des "OligotexTM mRNA Mini/Midi Kits" (Qiagen) PolyA+ mRNA isoliert. Mittels der Midi-Präparation konnte aus 1mg Gesamt-RNA ca. 30µg PolyA+ mRNA isoliert werden. Die Mini-Präparation lieferte aus 350µg Gesamt-RNA ca. 10µg. Die Isolierung erfolgte laut Herstellerangaben.

2.14.3 Konzentrationsmessung von RNA-Präparationen

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech). Eine OD_{260nm} von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40µg/ml. Die Reinheit der RNA kann über das Verhältnis der OD bei 260nm zur OD bei 280nm bestimmt werden, welches für proteinfreie Lösungen bei 1,8 - 2,0 liegt (Mülhardt, 2002).

2.14.4 Semiquantitative RT-PCR zur Aufnahme von Expressionsprofilen

Mittels des "RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit" (Fermentas) erfolgte eine cDNA-Erststrangsynthese laut Herstellerangaben mit einem Oligo(dT)18-Primer. Es wurden 5µg Gesamt-RNA (Kapitel 2.9) eingesetzt und cDNA in einem Endvolumen von 20µl erhalten. Unter der Annahme, dass der Anteil von PolyA+ mRNA in einer Gesamt-RNA Population ca. 2% (Mülhardt, 2002) beträgt, lag bei einer vollständigen Synthese eine Konzentration von 5ng/µl vor. Die sich der Reversen Transkription anschließende PCR ist nach folgendem Protokoll mit genspezifischen Primern (Kapitel 2.7, Tabelle 1) durchgeführt worden.

Ansatz:

2,5µl Template-sscDNA (40pg/µl)
2,5µl 10xPCR-Puffer (15mM MgCl₂)
1,0µl genspez. Primer Left (5pmol/µl)
1,0µl genspez. Primer Right (5pmol/µl)
0,5µl dNTP-Mix (10mM)
0,1µl Taq-DNA-Polymerase (5U/µl, Invitrogen/ Qbiogene)
17,4µl ddH₂O

25,0µl gesamt

Programm:

1 Zyklus: 94°C → 5'
27 Zyklen: 94°C → 30"
52°C → 1'
72°C → 1'30"
1 Zyklus: 72°C → 10'

In einem Fall (*BvPSK* [SSH-132]) wurde eine Reamplifikations-PCR durchgeführt. Hierzu wurde aus dem Original-PCR Ansatz ein Aliquot von 2,5µl unverdünnt als Template für die Reamplifikation verwendet. Der PCR-Ansatz blieb identisch, die Zyklenzahl wurde auf 20 reduziert.

Als Ladekontrolle wurde stets in einem separaten Ansatz das Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Gen (GAPDH, de Los Reyes *et al.*, nicht veröffentlicht, GenBank Acc. Nr. AW697769) unter gleichen Bedingungen amplifiziert. Von diesem 'house-keeping' Gen wird davon ausgegangen, dass es konstitutiv exprimiert wird. Die Primerwahl erfolgte derart, dass Kontaminationen der mRNA-Präparationen mit genomischer DNA durch Auftreten eines intronhaltigen GAPDH-Amplifikats angezeigt worden wären (Daten nicht gezeigt).

2.14.5 Northern-Blot Analyse

Es wurden 10µg Gesamt-RNA mit einem Volumen 2x RNA-Ladepuffer [197µl deion. Formamid; 64µl Formaldehyd; 39µl 20x RNA-Borat-Puffer; 0,4mg Bromphenolblau; 0,4mg Xylencyanol; 2µl Ethidiumbromid (c=10) ad 390µl ddH₂O_{DEPC}] versetzt, 10 Minuten bei 70°C denaturiert und in einem 0,8%igen Formaldehyd-Agarosegel [0,8 (w/v) Agarose; 5ml 20x RNA-Borat-Puffer; 16,7 ml 37%iges Formaldehyd; ddH₂O_{DEPC} ad 100ml] gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x RNA-Borat-Puffer eingesetzt [20x RNA-Borat-Puffer: 0,06M Tetraborat; 0,6M Borat; 4mM EDTA pH 8,0]. Die RNA wurde gemäß Standardprotokoll nach Sambrook *et al.* (1989) auf eine Nylonmembran (HybondTM N, Amersham Pharmacia Biotech) unter Verwendung von 20x SSC als Blotpuffer [3M NaCl; 0,3M NaCitrat] transferiert. Die RNA-Fixierung erfolgte durch zweistündige Inkubation der Membran bei +80°C. Zur Vorhybridisierung wurden die Northern-Blot Membranen bei 65°C in Church-Puffer geschwenkt [0,25M Natriumphosphat, pH 7,0; 0,7% (v/v) SDS; 50µg/ml Heringssperma-DNA]. Die Hybridisierung mit der entsprechenden radioaktiv markierten Sonde erfolgte über Nacht bei 65°C. Die Membranen wurden anschließend je 15 Minuten bei 65°C mit vier Waschlösungen ansteigender Stringenz (4x SSC / 0,1% SDS; 2x SSC / 0,1% SDS; 1x SSC / 0,1% SDS; 0,5x SSC / 0,1% SDS) gewaschen und mit einem Röntgenfilm bei -70°C unter Verwendung einer Verstärkerfolie exponiert.

Die Erstellung der Hybridisierungssonden erfolgte gemäß Herstellerangaben mittels des HexaLabelTM DNA Labeling Kit (Fermentas) mit 100ng des zu markierenden

Fragments und jeweils 3µl [α - 32 P]-dCTP (10µCi/µl). Über eine Sephadex® G-50 Säule wurden nicht inkorporierte [α - 32 P]-dCTP-Nukleotide vom markierten DNA-Fragment abgetrennt.

2.15 Erstellung einer cDNA Bank Nach-Ernte induzierter Gene der Zuckerrübe

Die Herstellung der Nach-Ernte cDNA Bank im pSPORT1-Vektor aus gelagerten Zuckerrüben erfolgte gemäß Herstellerangaben über das SuperScript™ Plasmid System (Invitrogen). Die cDNA Synthese wurde mit 5µg PolyA+ mRNA durchgeführt, die aus 3 und 46 Tagen bei 17°C gelagerten Zuckerrüben (Kapitel 2.8.1) isoliert worden war. Für die gerichtete Klonierung der cDNA-Fragmente in den Plasmid-Vektor pSPORT1 sind nur cDNA-Fragmente von mehr als 400bp Größe verwendet worden. Die erstellte cDNA-Bank wurde *via* Elektroporation in "EMDH10B™ Competent Cells" (Invitrogen) transformiert. Die Anzahl der rekombinanten Primärklone lag bei 2×10^5 . Die Bank wurde vollständig auf 28 LB/Carbenicillin-Platten ausgestrichen, so dass pro Platte ca. 8000 cfu vorlagen. Die Kolonien wurden mit je 5ml LB/Carbenicillin Flüssigmedium pro Platte abgewaschen, vereint, gemischt und in aliquotierter Form bei -70°C gelagert. Der Titer der amplifizierten cDNA-Bank lag bei $2,6 \times 10^{10}$ cfu/ml. Das Screening nach vollständigen cDNA-Klonen Nach-Ernte induzierter Gene der Zuckerrübe erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989). Als Hybridisierungssonden wurden die SSH-Fragmente verwendet, welche Nach-Ernte induzierte Gene der Zuckerrübe repräsentieren (Kapitel 2.11). Die größten erhaltenen cDNA-Klone wurden vollständig sequenziert.

2.16 RACE-PCR zur Identifizierung 5' vollständiger cDNA-Fragmente

Die RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends - PCR) stellt eine Methode zum Erhalt einer vollständigen cDNA aus PolyA+ mRNA dar. Es kam das Marathon™ cDNA Amplification Kit (Clontech) zum Einsatz. Das Ausgangsmaterial stellte eine aus PolyA+ mRNA generierte adaptorligierte cDNA-Bibliothek dar (Heike Reents, TU Braunschweig, Studienarbeit). Die PolyA+ mRNA stammte aus Zuckerrüben, die 46 Tage bei 17°C gelagert waren. Im Fall des Gens *BvGLP-r* (SSH-193) wurde mittels eines genspezifischen Primers (Kapitel 2.7, Tabelle 3) sowie eines Adaptorprimers AP1 (Clontech) die gewünschte cDNA in 5'-Richtung amplifiziert. Das Amplifikat wurde *via* TA-Klonierung in den pCR® 2.1 Vektor kloniert und vollständig sequenziert.

2.17 Isolierung genomischer Klone

Im Rahmen der Arbeit ist eine genomische Bank der Zuckerrübe erstellt im Lambda EMBL3 SP6/T7 Vektor zur Isolierung von Promotorregionen von Zuckerrübgengen verwendet worden (Stahl *et al.*, 2004). Die Isolierung der Lambda-DNA erfolgte nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989) über Großpräparationen *via* Dichtegradientenzentrifugation und über Minilysat-Präparationen. Außerdem wurde das Lambda Midi Kit (Qiagen) verwendet. Zur Vermehrung der Phagen wurde der *E. coli* Stamm XL1-Blue MRA genutzt.

Zunächst wurde die genomische Bank mit den vier *RsaI* geschnittenen SSH-Fragmenten SSH-7, -20, -153 und -227 (Kapitel 2.11) nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989) gescreent. Die Fragmente lagen im pCR[®]2.1 Vektor subkloniert vor, wurden *via* *RsaI* exzisiert, agarosegelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel aufgereinigt und mittels des HexaLabel[™] DNA Labeling Kits (Fermentas) radioaktiv markiert. Es wurden pro Sonde 20 Replikafilter von Platten à 8000 Plaques hybridisiert. Die im Autoradiogramm signalgebenden Plaques wurden in zwei weiteren Screens vereinzelt. Die in SM-Puffer [100mM NaCl, 8mM MgSO₄, 50mM Tris-HCl, 0,01% Gelatine, pH 7,5] aufgenommenen Phagen-Plaques wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des SSH-Fragments überprüft. Anschließend erfolgte die Isolierung der Lambda-DNA nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989).

Die Identifizierung der Promotorregion erfolgte über Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden (5'-Oligo), die homolog zum 5'-Ende der potentiell vollständigen cDNA-Klone waren. In Abbildung 1 ist die angewandte Strategie schematisch wiedergegeben. Die Lambda-DNA wurde mit einem Restriktionsenzym, das downstream des 5'-Oligos in der cDNA eine Schnittstelle aufweist, geschnitten (RE1, Abbildung 1). In Doppelspaltungen mit den Enzymen der begrenzenden RE-sites (RE2) des Lambda-Vektors entstehen Fragmente, die upstream der cDNA die putative Promotorregion enthalten. Die Enzyme RE1 und RE2 können zusätzliche Schnittstellen in der putativen Promotorregion upstream des 5'-Oligos aufweisen. Die mit dem 5'-Oligo hybridisierenden putativen Promotorfragmente wurden in Plasmid-Vektoren, die geeignete Restriktionsschnittstellen aufwiesen, subkloniert. In Tabelle 11 sind die Größen der Promotorfragmente, welche vollständig sequenziert wurden, aufgeführt. Die Promotorsequenzen sind im Anhang 7.1 aufgeführt.

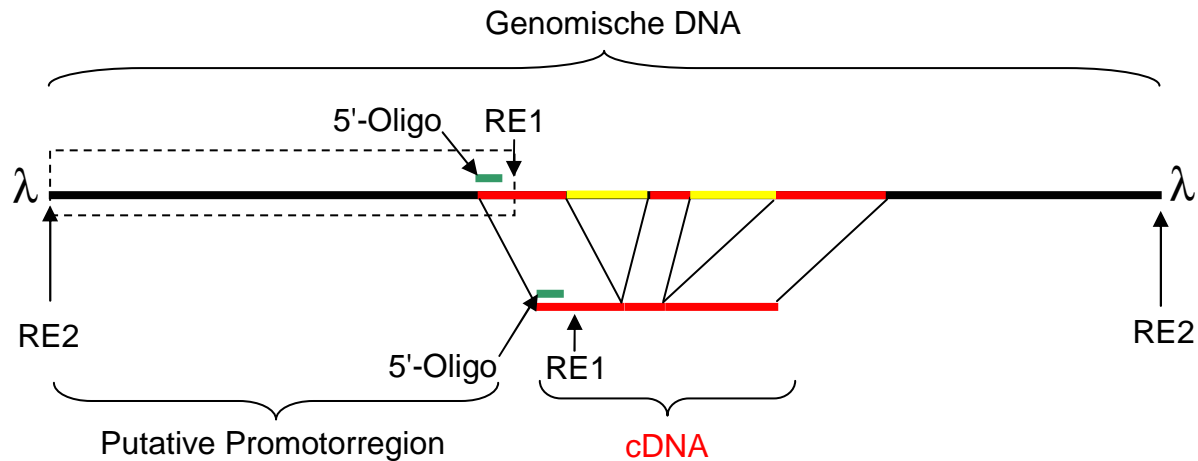


Abbildung 1: Schematische Darstellung der angewandten Methode zur Identifizierung der Promotorregion von Zuckerrüben Genen in rekombinanten Lambda-Klonen. Die horizontalen roten Balken stellen Exon-, die gelben Intron- und die schwarzen intergenische Bereiche dar. Der grüne Balken stellt das 5'-Oligonukleotid dar, das als Hybridisierungssonde verwendet wurde. RE1 steht für ein Restriktionsenzym, dessen Erkennungssequenz downstream vom 5'-Oligo liegt. Mit RE2 sind die flankierenden Restriktionsstellen im Vektor bezeichnet. Der gestrichelte Bereich gibt das hybridisierende Fragment wieder, welches die putative Promotorregion enthält.

Tabelle 11: Übersicht der subklonierten genomischen Fragmente Nach-Ernte induzierter Gene der Zuckerrübe. Angegeben sind die Klonierungsvektoren inklusive der verwendeten Schnittstellen, die Größe des genomischen Fragments sowie der Anteil regulatorischer Sequenz upstream des Translationsstarts, bzw. im Fall des Gens *BvNPCG2* (SSH-227) upstream des cDNA 5'-Endes.

Bezeichnungen			Schnittstellen	Genomisches Fragment [bp]	Sequenz 5' des ATG [bp]
SSH	Gen	Plasmidkonstrukt			
7	<i>BvHSP83</i>	pCR [®] 2.1-P- <i>HSP83</i>	<i>Xho</i> I / <i>Eco</i> RI	2836	2685
20	<i>BvCPRX1</i>	pCR [®] 2.1-P- <i>CPRX1</i>	<i>Bcl</i> I / <i>Bcl</i> I	4496	2066
153	<i>BvRIP-r1</i>	pCR [®] 2.1-P- <i>RIP-r1</i>	<i>Bam</i> HI / <i>Bam</i> HI	6553	5819
227	<i>BvNPCG2</i>	pBSK-P- <i>NPCG2</i>	<i>Xho</i> I / <i>Dra</i> I in <i>Eco</i> RV	2574	1263

2.18 Promotor-Luciferase Reportergenkonstrukte zur Expressionsanalyse in transgenen Zuckerrüben

Um eine Reportergenanalyse von vier Nach-Ernte induzierbaren Promotoren in der Zuckerrübe durchzuführen, wurden diese Promotoren mit dem Luciferase-Gen aus *Photinus pyralis* (LUC) im p1xW1-luc-kan T-DNA-Vektor gekoppelt. In Abbildung 2 ist die grundlegende Klonierungsstrategie wiedergegeben. Als genetisches Ausgangsmaterial dienten subklonierte genomische Fragmente (Tabelle 11) der

Gene *BvHSP83* (SSH-7), *BvCPRX1* (SSH-20), *BvRIP-r1* (SSH-153) und *BvNPCG2* (SSH-227), die den putativen Promotorbereich umfassen (Abbildung 2, grüner Bereich). Anhand der Sequenz wurden kurze Bereiche des Promotors mittels PCR amplifiziert, die upstream des Translationsstarts des jeweiligen Gens lokalisiert sind (Abbildung 2, grünes PCR-Fragment). Um die Fragmente gerichtet klonieren zu können, wurden die PCR-Primer so konzipiert, dass am 3'-Ende eine das Start-ATG des zugehörigen cDNA-Klons einschließende *NcoI*-Schnittstelle (C↓CATGG) lokalisiert ist. Eine Ausnahme stellte *BvNPCG2* dar. Da hier kein Leseraster vorliegt, wurde die *NcoI*-site am 5'-Ende des längsten cDNA-Klons generiert. Die PCR-Gegenprimer enthalten jeweils eine promotorspezifische Schnittstelle (spez. RE-site, Abbildung 2). Die Amplifikation erfolgte mittels des nachfolgenden Protokolls.

<u>Ansatz:</u>		<u>Programm:</u>
2,50µl	Template-DNA (1ng/µl)	1 Zyklus: 94°C → 2'
2,50µl	10xAdvantage-2-Puffer (Clontech)	25 Zyklen: 94°C → 30"
1,00µl	5'-Primer (5pmol/µl)	52°C → 1'
1,00µl	3'-Primer <i>NcoI</i> (5pmol/µl)	70°C → 2'
0,50µl	dNTP-Mix (10mM)	1 Zyklus: 70°C → 10'
0,25µl	Advantage-2-Polymerase (5U/µl, Clontech)	
17,25µl	ddH ₂ O	
25,00µl	gesamt	

Anschließend wurde eine Restriktionsspaltung mit *NcoI* und dem promotorspezifischen Restriktionsenzym durchgeführt und die geschnittenen PCR-Fragmente mittels des QIAQuick® PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt.

Da für die PCR-LUC-Kopplung eine *NcoI*-Schnittstelle verwendet wird, konnten aufgrund des mehrfachen Auftretens von *NcoI*-Schnittstellen im p1xW1-luc-kan Vektor die Klonierungen nicht direkt in diesem Vektor erfolgen. Daher wurde das LUC-Gen *via NcoI / SacI* aus dem p1xW1-luc-kan Vektor exzisiert (Abbildung 2, blaues LUC-Gen) und aufgereinigt. Es erfolgte die Klonierung über *NcoI / SacI* in die Vektoren pCMV•SPORT6 und pBKS. Die resultierenden Plasmide werden als pCMV•SPORT6-LUC und pBKS-LUC bezeichnet.

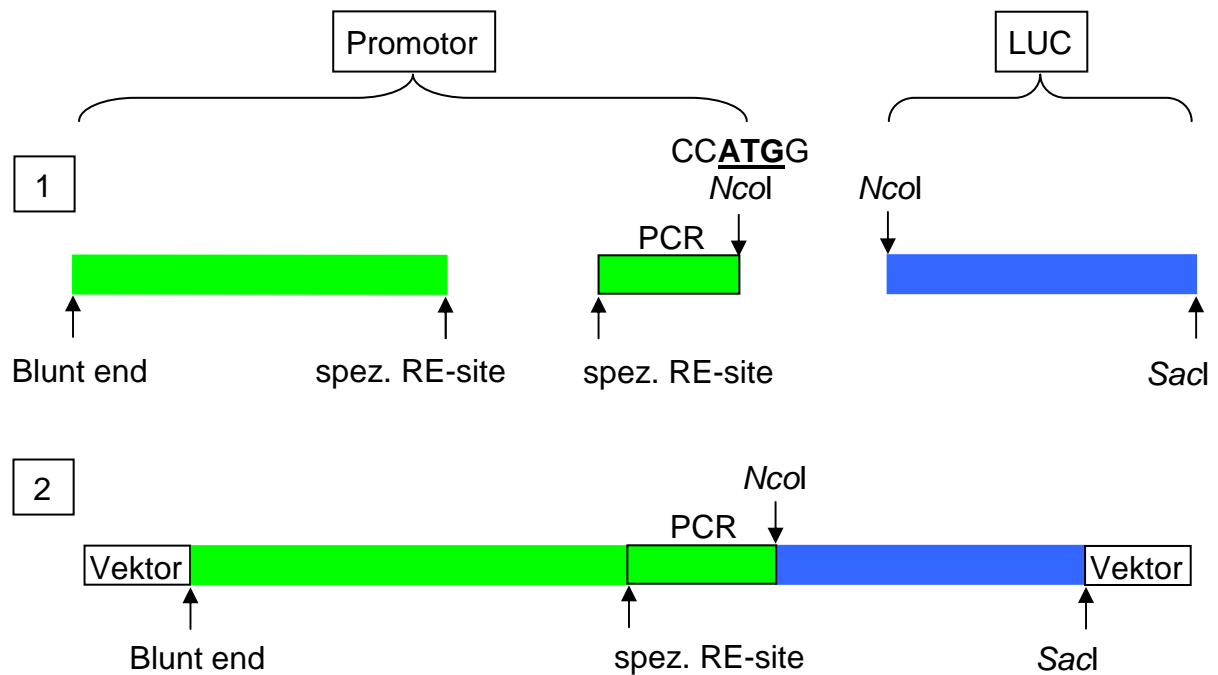


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Einzelkomponenten zur Erzeugung von Promotor-Luciferasekonstrukten (1) sowie deren Assemblierung (2). Grün dargestellt sind der zu klonierende Promotor und ein *via* PCR amplifizierter Promotoranteil. Der blaue Balken gibt das LUC-Gen wieder. Die *SacI*- und die *via* PCR generierte *NcoI*-Schnittstelle, welche das Start-ATG (unterstrichen) umfasst, sind universell bei allen vier Promotor-Luciferase Konstrukten verwendet worden. Die spezifische RE-site ist promotorabhängig.

Es folgte eine zweistufige Subklonierung. Zunächst wurde das PCR-Amplifikat über *NcoI* mit dem LUC-Gen fusioniert. Dies erfolgte entweder in pCMV•SPORT6-LUC oder in pBKS-LUC. Im zweiten Schritt wurde über die promotorspezifische (spez. RE-site, Abbildung 2) und eine weitere Schnittstelle das restliche Promotorfragment subkloniert. Das vollständige Promotor-PCR-LUC-Konstrukt wurde anschließend in den ursprünglichen p1xW1-luc-kan T-DNA-Vektor kloniert. Dazu wurden aus dem T-DNA-Vektor der 1xW1 Promotor und das luc-Gen eliminiert und durch das Promotor-PCR-LUC-Konstrukt ersetzt.

Da sich die Klonierungsstrategien für die vier Promotoren im Detail unterscheiden, wird das exakte Vorgehen anhand von Fließschemata im Folgenden erläutert. Hierbei ist zunächst das Fließschema abgebildet und der erläuternde Text ist der nachfolgenden Seite zu entnehmen. Um die Bezeichnungen der einzelnen Konstrukte möglichst kurz zu halten, wurde auf den Zusatz *Bv* (*Beta vulgaris*) im Namen der Nach-Ernte induzierten Gene verzichtet.

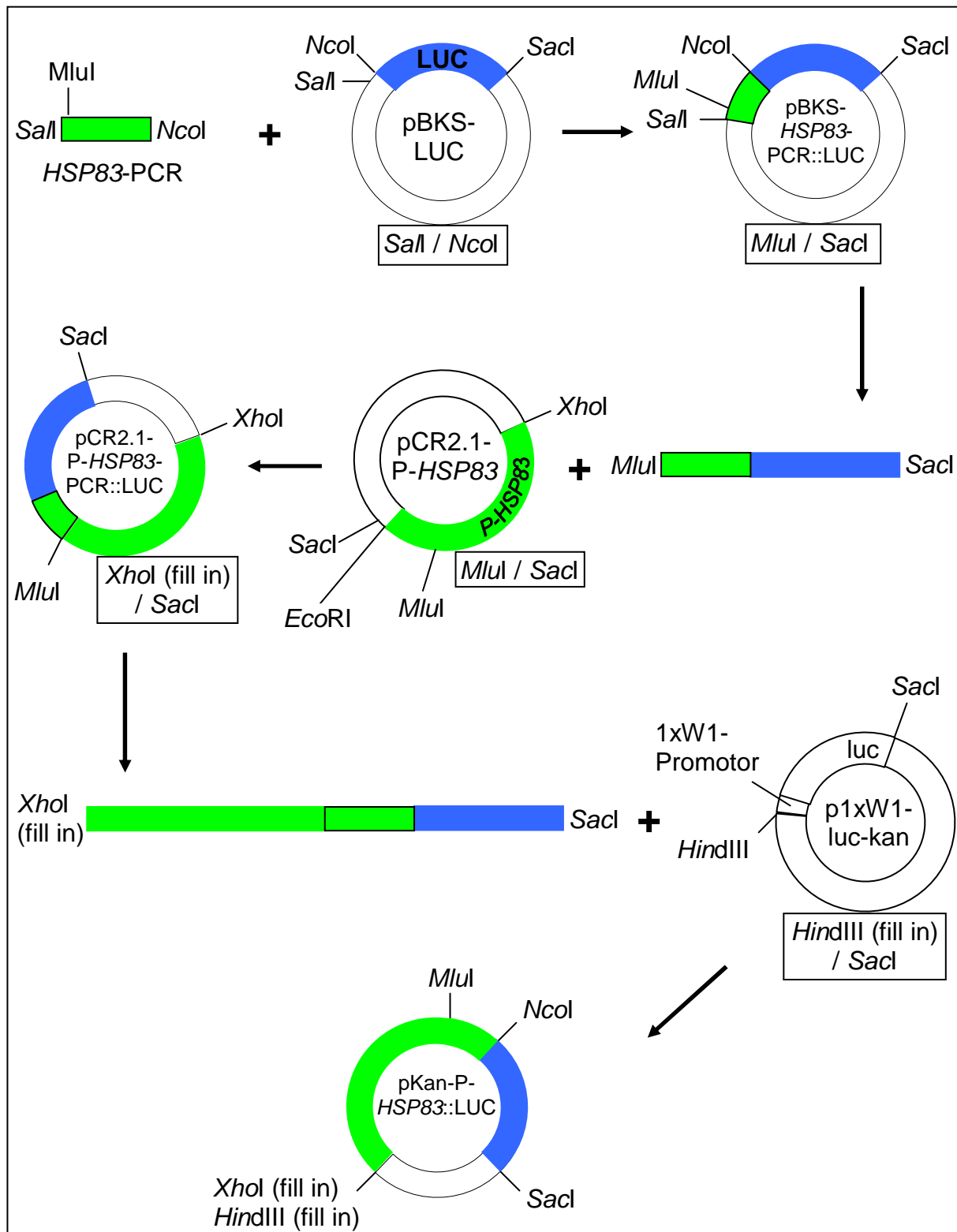


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des Promotor-Luciferase-Konstrukts für den Promotor P-*BvHSP83* (SSH-7). Mit den rechteckig umrahmten Restriktionsenzymen wurden die Vektorspaltungen durchgeführt.

Promotor-Luciferase-Konstrukt P-*BvHSP83* (SSH-7):

Es wurde ein 296bp großes PCR-Fragment erzeugt (Abbildung 3, *HSP83*-PCR). Nach Spaltung des PCR-Produkts mit *SaI* und *NcoI* sowie einer anschließenden Aufreinigung erfolgte die Ligation in das *SaI* / *NcoI* geschnittene pBKS-LUC Plasmid (Abbildung 3, pBKS-*HSP83*-PCR::LUC). Durch Sequenzierung wurde die Identität des PCR-Produkts mit dem Ausgangsfragment verifiziert.

Das PCR::LUC Fragment wurde mit *MluI* und *SacI* aus pBKS-*HSP83*-PCR::LUC exzisiert und in das *MluI* / *SacI* geschnittene pCR2.1-P-*HSP83* Plasmid (Tabelle 11) kloniert. Aus der Klonierung ging pCR2.1-P-*HSP83*-PCR::LUC hervor.

Das P-*HSP83*-PCR::LUC Fragment wurde mit *XhoI* und *SacI* exzisiert, die *XhoI* Schnittstelle glattendig aufgefüllt (fill-in) und das Fragment in den *HindIII* (fill-in) / *SacI* geschnittenen T-DNA-Vektor p1xW1-luc-kan kloniert. Die *SacI*-site blieb erhalten, während die zusammenligierten geglätteten *XhoI*- und *HindIII*-sites nicht mehr funktionell sind. Das erhaltene T-DNA Konstrukt trägt den Namen pKan-P-*HSP83*::LUC und enthält 2685bp putative Promotorregion upstream des LUC-Gens.

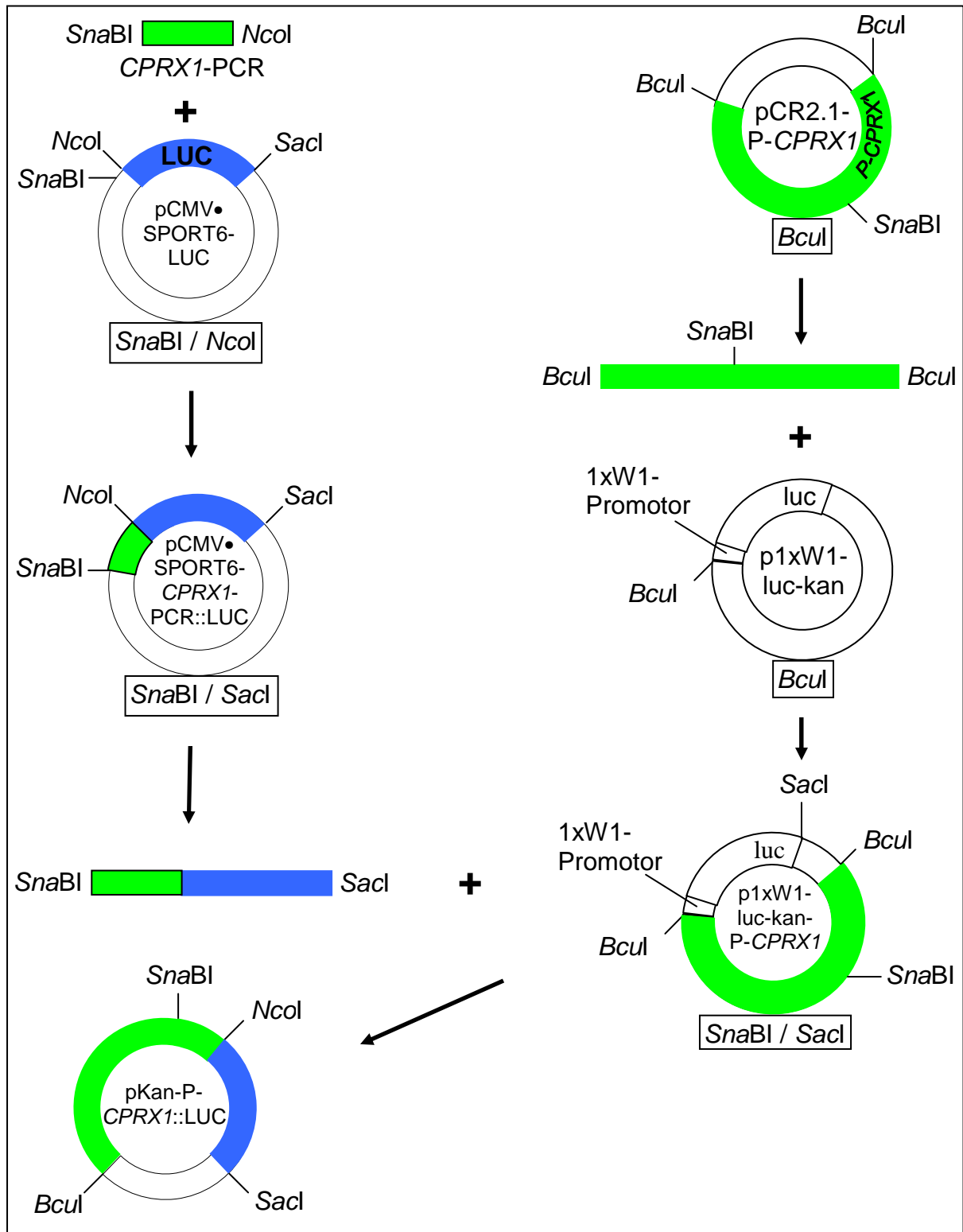


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des Promotor-Luciferase-Konstrukts für den Promotor P-BvCPRX1 (SSH-20). Mit den rechteckig umrahmten Restriktionsenzymen wurden die Vektorspaltungen durchgeführt.

Promotor-Luciferase-Konstrukt P-*BvCPRX1* (SSH-20):

Es wurde ein 252bp großes PCR-Fragment erzeugt (Abbildung 4, *CPRX1*-PCR). Nach Spaltung des PCR-Produkts mit *Sna*BI und *Nco*I sowie einer anschließenden Aufreinigung erfolgte die Ligation in das *Sna*BI / *Nco*I geschnittene pCMV•SPORT6-LUC Plasmid (Abbildung 4, pCMV•SPORT6-*CPRX1*-PCR::LUC). Durch Sequenzierung wurde die Identität des PCR-Produkts mit dem Ausgangsfragment verifiziert.

Parallel wurde aus dem pCR2.1-P-*CPRX1* Plasmid (Tabelle 11) ein 4496bp großes genomisches Fragment (Abbildung 4, rechts) *via Bcu*I exzisiert und in den *Bcu*I geschnittenen p1xW1-luc-kan T-DNA-Vektor kloniert. Da keine gerichtete Klonierung vorlag, wurde über Restriktionsspaltungen ein Klon identifiziert bei dem das 3'-Ende des genomischen Fragments an den 1xW1-Promotor fusioniert war (Abbildung 4, p1xW1-luc-kan-P-*CPRX1*).

Das PCR::LUC-Fragment wurde aus pCMV•SPORT6-*CPRX1*-PCR::LUC mit *Sna*BI / *Sac*I exzisiert und in das *Sna*BI / *Sac*I geschnittene p1xW1-luc-kan-P-*CPRX1* Plasmid kloniert. Im erhaltenen T-DNA Konstrukt pKan-P-*CPRX1*::LUC liegen 2066bp putative Promotorregion des Gens *BvCPRX1* (SSH-20) in Fusion mit dem LUC-Gen vor.

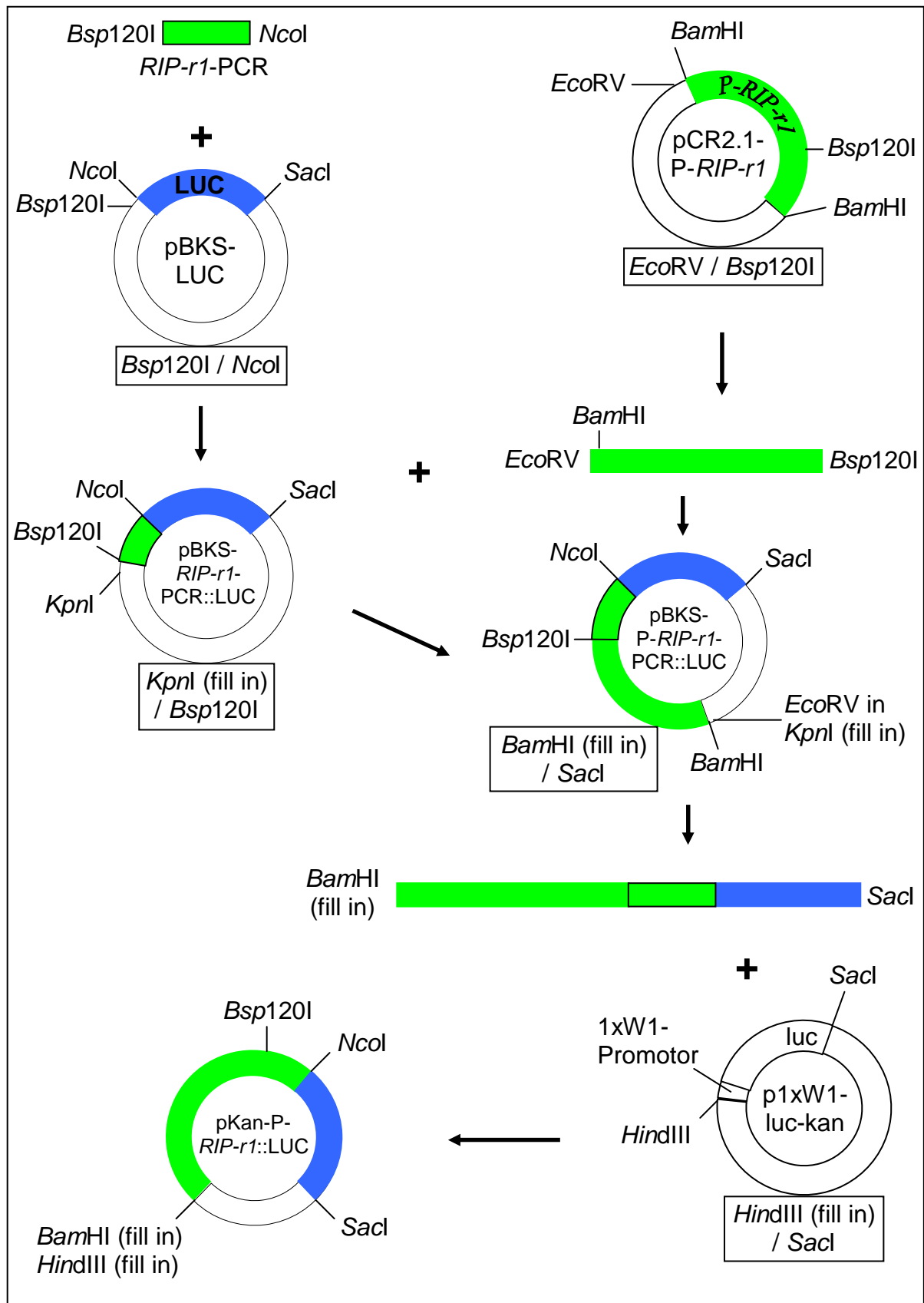
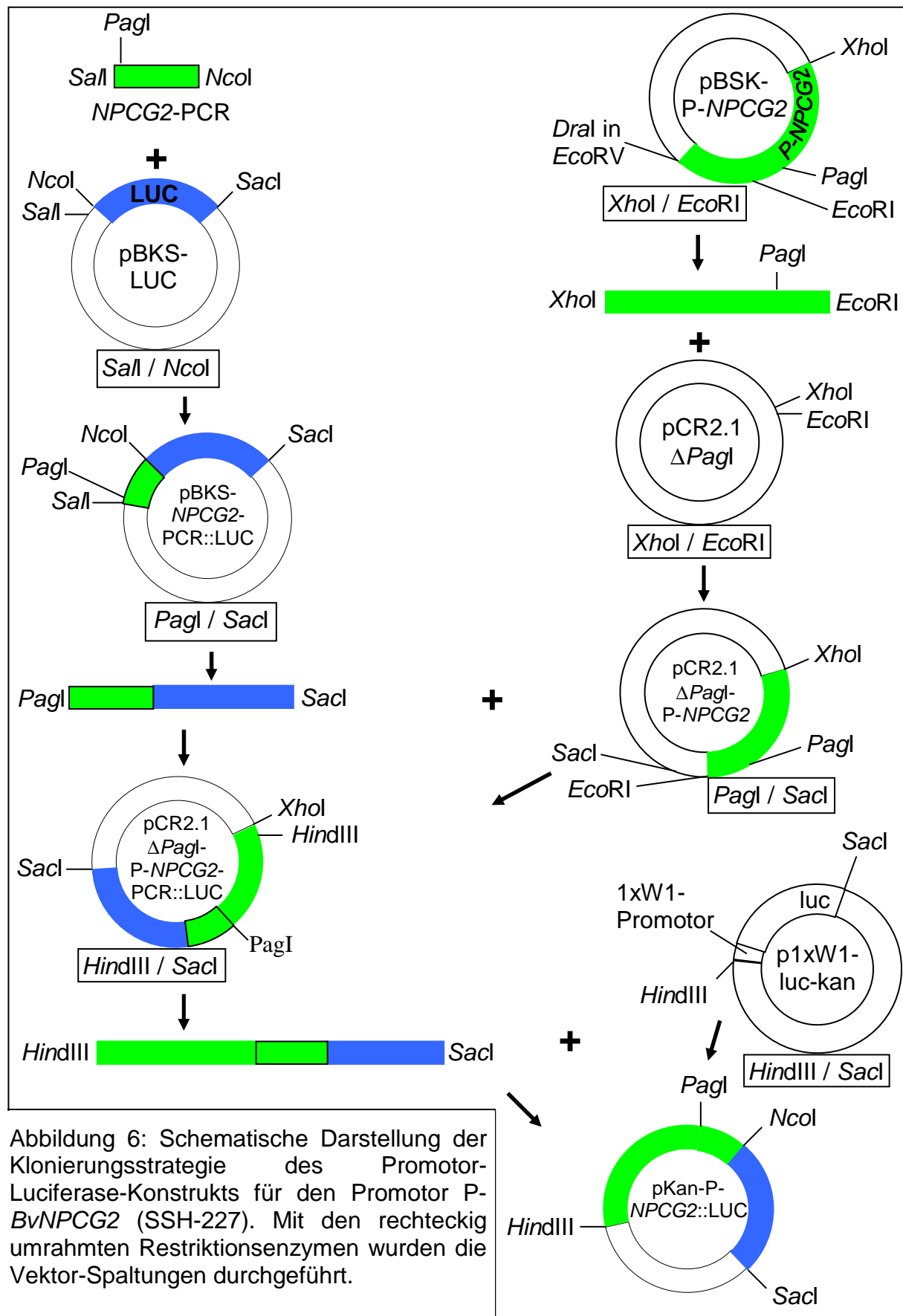


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des Promotor-Luciferase-Konstrukts für den Promotor P-BvRIP-r1 (SSH-153). Mit den rechteckig umrahmten Restriktionsenzymen wurden die Vektorspaltungen durchgeführt.

Promotor-Luciferase-Konstrukt P-*BvRIP-r1* (SSH-153):

Es wurde ein 758bp großes PCR-Fragment erzeugt (Abbildung 5, *RIP-r1*-PCR). Nach Spaltung des PCR-Produkts mit *Bsp120I* und *NcoI* sowie einer anschließenden Aufreinigung erfolgte die Ligation in das *Bsp120I* / *NcoI* geschnittene pBKS-LUC Plasmid (Abbildung 5, pBKS-*RIP-r1*-PCR::LUC). Durch Sequenzierung wurde die Identität des PCR-Produkts mit dem Ausgangsfragment verifiziert.

Parallel wurde aus pCR2.1-P-*RIP-r1* (Tabelle 11) ein Fragment, das 5072bp genomische Sequenz umfasst, *via EcoRV* (site in Vektor-MCS) und *Bsp120I* exzisiert und direktional in das *KpnI* (fill in) / *Bsp120I* geschnittene pBKS-*RIP-r1*-PCR::LUC Plasmid kloniert. Das entstandene Plasmid trägt den Namen pBKS-P-*RIP-r1*-PCR::LUC. Aus diesem wurde über eine *BamHI* / *SacI* Spaltung, unter Glättung der *BamHI*-site (fill in), das P-*RIP-r1*-PCR::LUC Fragment exzisiert und in den *HindIII* (fill in) / *SacI* geschnittenen p1xW1-luc-kan T-DNA-Vektor kloniert. Die *SacI*-site blieb erhalten, während die zusammenligierten geglätteten *BamHI*- und *HindIII*-sites nicht mehr funktionell sind. Das erhaltene T-DNA Konstrukt trägt den Namen pKan-P-*RIP-r1*::LUC und enthält 5819bp putative Promotorregion upstream des LUC-Gens.



Promotor-Luciferase-Konstrukt P-*BvNPCG2* (SSH-227):

Das Gen *BvNPCG2* (SSH-227) unterscheidet sich von den zuvor gezeigten, weil die zugehörige cDNA kein längeres offenes Leseraster aufweist. Aus diesem Grund konnte das LUC-Gen positionell nicht mit einem bereits vorhandenen Start-ATG fusioniert werden, sondern wurde mit dem potentiellen Promotorbereich am 5'-Ende der cDNA fusioniert.

Es wurde ein 280bp großes PCR-Fragment erzeugt (Abbildung 6, *NPCG2*-PCR). Nach einer *SaI* / *NcoI* Spaltung und anschließender Aufreinigung wurde das PCR-Amplifikat in das *SaI* / *NcoI* geschnittene pBKS-LUC Plasmid kloniert (Abbildung 6, pBKS-*NPCG2*-PCR::LUC). Durch Sequenzierung wurde die Identität des PCR-Produkts mit dem Ausgangsfragment verifiziert.

Parallel wurde aus pBSK-P-*NPCG2* (Tabelle 11) ein 1282bp großes genomisches Fragment *via XhoI* und *EcoRI* exzisiert (Abbildung 6, rechts) und in den *XhoI* / *EcoRI* geschnittenen pCR2.1 Δ *Pagl* Vektor kloniert (Abbildung 6, pCR2.1 Δ *Pagl*-P-*NPCG2*). Da im Zuge der Promotor-PCR-Fragment Kopplung die *Pagl*-site benutzt wird, musste die im ursprünglichen pCR2.1 Vektor (Invitrogen) vorliegende *Pagl*-site durch Auffüllen (fill-in) entfernt werden (pCR2.1 Δ *Pagl*).

Das in pBKS-*NPCG2*-PCR::LUC vorhandene PCR::LUC Fragment wurde mittels *Pagl* / *SacI* exzisiert und hinter ein 1004bp großes Promotorfragment vorliegend im *Pagl* / *SacI* geschnittenen pCR2.1 Δ *Pagl*-P-*NPCG2* kloniert. Aus der Klonierung ging pCR2.1 Δ *Pagl*-P-*NPCG2*-PCR::LUC hervor. Abschließend wurde aus diesem Plasmid das P-*NPCG2*-PCR::LUC Fragment *via HindIII* / *SacI* exzisiert und in den *HindIII* / *SacI* geschnittenen p1xW1-luc-kan T-DNA-Vektor kloniert. Das erhaltene T-DNA Konstrukt trägt den Namen pKan-P-*NPCG2*::LUC und enthält 1113bp putative Promotorregion upstream des LUC-Gens.

In Tabelle 12 ist eine Übersicht der vier hergestellten Konstrukte gezeigt. Diese wurden in den *A. tumefaciens* Stamm GV3101 transformiert und bei der Planta GmbH (Einbeck) in die Zuckerrübe eingebracht. Die Transgenität der Zuckerrüben wurde durch Amplifikation eines 553bp großen Bereichs aus dem Selektionsmarkergen (kan) codierend für die Neomycinphosphotransferase bestätigt (D. Stahl, pers. Mitteilung). In ausstehenden Untersuchungen soll die Reporterexpression durch Luciferaseaktivitätsmessungen in gelagerten transgenen Zuckerrüben analysiert werden.

Die Verwendung der vier Promotoren zur Nach-Ernte Induktion (Post Harvest Induced, PHI) biotechnologisch relevanter Gene ist durch die KWS Saat AG zum Patent angemeldet.

Tabelle 12: Übersicht der Promotor-LUC-Gen T-DNA-Konstrukte Nach-Ernte induzierbarer Promotoren der Zuckerrübe.

Bezeichnungen				Mit dem LUC-Gen fusionierte Promotor-Sequenz [bp]
SSH-Name	Promotor	T-DNA-Konstrukt	T-DNA-Konstrukt in Patentschrift	
7	P-BvHSP83	pKan-P-HSP83::LUC	PHI7-luc-kan	2685
20	P-BvCPRX1	pKan-P-CPRX1::LUC	PHI20-luc-kan	2066
153	P-BvRIP-r1	pKan-P-RIP-r1::LUC	PHI153-luc-kan	5819
227	P-BvNPCG2	pKan-P-NPCG2::LUC	PHI227-luc-kan	1113

2.19 T-DNA-Konstrukte Nach-Ernte induzierter Gene zur Überexpression in *Arabidopsis thaliana*

Die Analyse Nach-Ernte induzierter Zuckerrübengene im heterologen System *A. thaliana* sollte über eine CaMV 35S-Promotor (Ow *et al.*, 1986) vermittelte konstitutive Überexpression realisiert werden. Hierzu sind die cDNA-Inserts der Gene *BvCPRX1* (SSH-20), *BvPSK* (SSH-132), *BvBPM1* (SSH-254) und *BvNPCG3* (SSH-334) mittels *Sma*I und *Hind*III aus den entsprechenden cDNA-Klonen (Kapitel 3.1.1, Tabelle 16) exzisiert worden. Als T-DNA-Vektor kam das pVKH-35S-pA1 Plasmid zum Einsatz, welches zunächst mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten wurde. Die *Bam*HI-Schnittstelle wurde glattendig aufgefüllt, so dass die *Sma*I / *Hind*III cDNA-Inserts direktional ligiert werden konnten. Die klonierten Inserts enthielten jeweils das vollständige offene Leseraster inklusive Start- und Stopcodon des entsprechenden Nach-Ernte induzierten Gens. Im Fall des nicht proteincodierenden Gens *BvNPCG3* lagen Start- und Stopcodon nicht vor, es wurde auch hier das komplette cDNA-Insert subkloniert.

Der T-DNA-Vektor enthält 5' zur eingefügten cDNA den 35S-Promotor und 3' eine zusätzliche Polyadenylierungssequenz (pA1). Neben dem beschriebenen Promotor-Zielgen-Konstrukt befinden sich zwischen der rechten und linken border-Sequenz eine bakterielle Kanamycinresistenz sowie eine pflanzliche Hygromycinresistenz, reguliert durch den Promotor des Nopalinsynthase-Gens.

2.20 Bioinformatische Nukleotidsequenz-Analyse

Im Rahmen der Arbeit sind Nukleotidsequenzen von Zuckerrübenengen auf das Vorhandensein *cis*-regulatorischer Elemente untersucht worden. Die Analysen wurden vornehmlich mit online verfügbaren bioinformatischen Programmen aus der Gruppe der Regulatory Sequence Analysis Tools (RSAT) durchgeführt (van Helden, 2003).

2.20.1 Sequenzvergleichende Promotor-Analyse mit dem Programm "consensus"

Zur Identifizierung konservierter DNA-Motive innerhalb von vier Nach-Ernte induzierbaren Promotoren diente das Programm "consensus", welches online unter der Web-Adresse <http://rsat.ulb.ac.be/rsat/> zur Verfügung steht. Es wurden die Promotoren der Gene *BvHSP83* (SSH-7), *BvCPRX1* (SSH-20), *BvRIP-r1* (SSH-153) und *BvNPCG2* (SSH-227) analysiert. Das Programm detektiert im verwendeten Datensatz sequenzähnliche Motive nach Vorgabe der Motivlänge. Hierzu wurden im Web-Interface je 1000bp regulatorische Sequenz upstream des ATG (inkl.) eingegeben. Im Fall des nicht proteincodierenden Gens *BvNPCG2* wurden 1000bp upstream des 5'-cDNA-Endes verwendet. Gleiches gilt für das Gen *BvRIP-r1*, da in der 5'-UTR ein Leader-Intron vorlag. Die Suche nach konservierten DNA-Motiven wurde für Motivlängen von 6 bis 10bp in Ein-Basenpaarschritten durchgeführt. Hierbei wurden alle vier Promotoren gleichzeitig und in Dreier-Kombinationen analysiert. Das AT:GC-Verhältnis ist auf 0,325:0,175 in Anlehnung an den pflanzlichen Modellorganismus *A. thaliana* angepasst worden. Ansonsten wurden die voreingestellten Parameter unverändert übernommen. Die Ausgabe des Ergebnisses erfolgt in Form von Alignment-Matrizen (Hertz und Stormo, 1999), die das jeweils identifizierte Motiv in den analysierten Sequenzen repräsentieren.

2.20.1.1 Erzeugung von Zufallssequenzen definierter Länge und definierten AT-Gehalts

Die Aussage, ob *cis*-regulatorische Elemente, die mit dem Programm "consensus" detektiert wurden, gehäuft oder gemindert in bioinformatisch analysierten DNA-Sequenzen auftreten, verlangt nach Vergleichsanalysen. Zu diesem Zweck wurden mittels des Programms SeqToMatrix (Claudia Galuschka, TU Braunschweig, pers. Mitteilung) Zufallssequenzen erzeugt, die in Länge und AT-Gehalt identisch mit den

laut Kapitel 2.20.1 analysierten vier Nach-Ernte induzierbaren Promotoren der Gene *BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2* waren. Zu jedem Promotor wurde ein Datensatz mit fünf Zufallssequenzen erzeugt, so dass vier Datensätze mit je fünf Sequenzen vorlagen. Das Perl-Programm *CGcompareTWOSequences* (C. Galuschka, pers. Mitteilung) diente der Ermittlung der AT-Gehalte. Auf die Zufallssequenzen wurde ein matrizenbasiertes Sequenzscreening mit den Matrizen aus der "consensus-Analyse" mittels des in Kapitel 2.20.2 beschriebenen Programms "patser matrices" angewendet. Wenn "patser matrices" unter den gewählten experimentellen Bedingungen ein Sequenzmotiv mit der eingesetzten Matrize detektiert, wird von einem Match gesprochen.

Die jeweilige Anzahl der einzelnen Matrizen-Matches in den Zufallssequenzen wurde mit den Matches in den vier Nach-Ernte induzierbaren Promotoren verglichen. Die Bewertung des Analyse-Ergebnisses erfolgte mittels statistischer Methoden, die in Kapitel 2.24 beschrieben sind.

2.20.2 Matrizenbasierte Sequenzanalyse mit dem Programm "patser matrices"

Zur Identifizierung putativer Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFB-sites) in vier Nach-Ernte induzierbaren Promotoren sowie in Referenzpromotoren, die keine Nach-Ernte Induktion vermitteln, diente das Programm "patser matrices". Das Programm ist online verfügbar unter der Web-Adresse <http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>. Für die Analyse wurden Alignment-Matrizen, die bekannte TFB-sites beschreiben, benötigt. Es wurden 45 Matrizen aus 15 Klassen in die Analyse einbezogen, die TFB-sites im *A. thaliana* Genom detektieren, zuzüglich einer TATA-Box-Matrize nach Shakhmuradov *et al.* (2003). Die Matrizen sowie die entsprechenden Referenzen sind in der AthaMap-Datenbank annotiert (Steffens *et al.*, 2004 und 2005). In Tabelle 13 sind die Namen der Transkriptionsfaktor-Klassen und die Namen der dazugehörigen Faktoren, aus deren Bindungsstellen die verwendeten Matrizen abgeleitet sind, aufgeführt. Die Herkunft der analysierten Promotorsequenzen ist in Tabelle 14 wiedergegeben. Auf das Vorhandensein potentiell *cis*-regulatorischer Elemente wurden insgesamt 1000bp upstream und einschließlich des Start-ATGs untersucht. Im Fall des *BvNPCG2* Gens wurden 1000bp upstream der cDNA verwendet. Das *BvRIP-r1* Gen wies in der 5'-UTR ein 2115bp langes Leader-Intron auf. In die bioinformatische Analyse sind 1000bp upstream der Spleiß-Donorstelle eingegangen.

Die voreingestellten Parameter im "patser matrices" Web-Interface wurden zunächst unverändert übernommen, mit Ausnahme der Anpassung des AT:GC-Verhältnisses auf 0,325:0,175, welches dem von *A. thaliana* als pflanzlichem Modellorganismus entspricht. Das Programm "patser matrices" generiert automatisch aus der eingegebenen Alignment-Matrize die zugehörige Weight-Matrize (Hertz und Stormo, 1999) unter Ausgabe der charakteristischen Minimal-, Maximal- und Auto-Score Werte. Alle Matches, bei denen der Score zwischen Auto- und Maximal-Score liegt, repräsentieren potentielle TFB-sites.

Zur Steigerung der Signifikanz eines detektierten Motivs erfolgte in einem zweiten Screen eine matrizenabhängige Auto-Score-Erhöhung auf 65% bzw. 75% des Max-Scores der jeweiligen Matrize. Dieser Wert wurde im Web-Interface unter der Position "lower threshold estimation" eingetragen (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>). Bei den nachstehenden Matrizen wurden 75% des Maximal-Scores für das Screening verwendet (TGA1, DOF1-3, PBF, RAV1[2], TEIL, GAMYB, P, NtMYBAS, HVH21), bei folgenden 65% (O2, AGL3, AGL15, SBF1, PCF2, PCF 5, HAHB4, AGP1) und bei den übrigen der von "patser matrices" ausgegebene Auto-Score.

Tabelle 13: Bekannte pflanzliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen, deren zugehörige Matrizen in der matrizenbasierten Sequenzanalyse Verwendung fanden.

Transkriptionsfaktor-Klassen	Zugehörige Transkriptionsfaktoren
bZIP	ABF1, bZIP910[1], bZIP910[2], bZIP911[1], bZIP911[2], TGA1, O2
bHLH	PIF3[1], PIF3[2]
DOF	DOF1, DOF2, DOF3, PBF
MADS	AG, AGL3, AGL15
AP2/EREBP	ABI4[1], ABI4[2], ANT, RAV1[2] TEIL, DRF1, CBF1
MYB	AtMYB15, AtMYB77, AtMYB84, CDC5, GAMYB, MYB.PH3[1], MYB.PH3[2], P, NtMYBAS
Trihelix	SBF1
TCP	PCF2, PCF5
HD-Kn	HVH21
HD-PHD	ALFIN1
HD-ZIP	ATHB1, ATHB5, ATHB9, HAHB4
GATA	AGP1
WRKY	ZAP1
C2H2 (Zn)	ID1
-	ARF1

Tabelle 14: In die matrizenbasierte Sequenzanalyse einbezogene Promotoren. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der zugehörigen Gene, die Homologie, Acc. Nr. der Promotorsequenz und die Referenz.

Gen-Name	Homologie	Acc. Nr.:	Sequenzherkunft
<i>BvHSP83</i> (SSH-7)	Heat Shock Protein		Kapitel 3.3
<i>BvCPRX1</i> (SSH-20)	Kationische Peroxidase		Kapitel 3.3
<i>BvRIP-r1</i> (SSH-153)	Ribosomen inaktivierendes Protein Typ I		Kapitel 3.3
<i>BvNPCG2</i> (SSH-227)	-		Kapitel 3.3
<i>BvTlp2</i>	Thaumatococcus-like protein		Oltmanns, 2005
<i>BvSmp</i>	-		Oltmanns, 2005
<i>BvHis1-r</i>	Linker Histon		Oltmanns, 2005
<i>BvMII</i>	Major latex like protein		Oltmanns, 2005
<i>BvTlp1</i>	Thaumatococcus-like protein		Oltmanns, 2005
<i>Bvcab11</i>	Chlorophyll AB Binding Protein	AX449166	Stahl <i>et al.</i> , 2004
<i>Bvcab12</i>	Chlorophyll AB Binding Protein	AX449167	Stahl <i>et al.</i> , 2004
X12	β 1-3 Glucanase		Stahl, unveröffentlicht
SAP3	Subtilisin ähnliche Protease		Stahl, unveröffentlicht
<i>BvPAL</i>	Phenylalanin-Ammonium-Lyase	AJ810175	Schmidt <i>et al.</i> , 2004
BV-16/1	V-ATPase Subunit C	Y11037	Lehr <i>et al.</i> , 1999
BV-70/5	V-ATPase Subunit A	Y11038	Lehr <i>et al.</i> , 1999
Ch1	Chitinase	X79301	Berglund <i>et al.</i> , 1995
Protox	Protoporphyrinogen-Oxidase	AX282692	Fonne-Pfister <i>et al.</i> , 2001

2.20.3 Bioinformatische Analyse von 5'-UTR Sequenzen

Da die 5'-UTR eines Gens auch *cis*-regulatorische Elemente enthalten kann, wurden von 16 Nach-Ernte induzierten Genen die Sequenzen upstream des Translationsstarts bioinformatisch untersucht. In die Analyse wurden 15 Gene aus dem SSH-Experiment zur Anreicherung Nach-Ernte induzierter Gene (Kapitel 2.11, Tabelle 10 mit Ausnahme von *BvHSP83* [SSH-7]) sowie das Nach-Ernte induzierte Gen *BvTlp2* (Oltmanns, 2005) einbezogen. Die analysierten Sequenzen stammen aus cDNA-Klonen (Tabelle 16, Kapitel 3.1.1) und im Fall des *BvTlp2*-Gens aus einem genomischen Klon. Wenn kein Start-ATG vorlag, dem ein durchgehendes Leseraster hätte zugewiesen werden können, wurden 280bp downstream des 5'-cDNA-Klon-Endes analysiert. Dieser Wert resultiert aus der längsten detektierten 5'-UTR von 230bp (Gen *BvRIP-r2* [SSH-292]) plus einen frei gewählten Sequenzbereich von 50bp. Im Fall des *BvTlp2*-Gens lag kein cDNA-Klon vor. Ausgehend von der bekannten Promotor-Sequenz (Oltmanns, 2005) und der Position des Start-ATGs im

Homolog wurden 280bp upstream des Translationsstarts für die bioinformatische Analyse gewählt.

Weiterhin sind 5'-UTR-Sequenzen von 951 Zuckerrübingenen von Andreas Menze (KWS Saat AG, Einbeck) bioinformatisch analysiert worden.

Neben den zuckerrübenspezifischen Sequenzen wurden in die 5'-UTR Analyse auch Sequenzen aus zuckerrübenfremden pflanzlichen Spezies einbezogen. Die Sequenzen stammen aus der PlantProm Database (Shahmuradov *et al.*, 2003), in der jeweils 50bp downstream des Transkriptionsstartpunktes annotiert sind.

2.21 Bioinformatische Tools zur Vorhersage subzellulärer Proteinlokalisierungen

Im Zuge dieser Arbeit sind mittels der "ExPASy-Proteomic Tools" (<http://www.expasy.ch/tools/>) Prädiktionen über die Lokalisierung von Proteinen gemacht worden. Das Programm PSORT (Nakai und Kanehisa, 1991) dient der Vorhersage subzellulärer Lokalisierungen wie auch einer möglichen Sekretion anhand des Vorhandenseins bekannter Signalpeptidsequenzen. Zur Prädiktion von Transmembranregionen und der Orientierung von Aminosäureketten in Membranen dient das Tool TMPred (Hofmann und Stoffel, 1993). Die Bestimmung des pI-Werts erfolgte über das Programm ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005).

2.22 Bioinformatisches Tool zur Sekundärstrukturvorhersage einzelsträngiger RNA

Gentranskripte weisen, aufgrund der Fähigkeit komplementärer Basen Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, häufig komplexe Sekundärstrukturen auf. Mittels des lokal installierten Programms "RNAstructure" (Mathews, 2004), das frei unter der Web-Adresse <http://rna.chem.rochester.edu/index.html> verfügbar ist, können so genannte Haarnadelstrukturen (hairpin) identifiziert werden, die möglicherweise als Vorläuferstrukturen zur Entstehung von microRNAs (miRNA) fungieren. Das Programm berechnet die aus energetischer Sicht wahrscheinlichste Faltung des eingegebenen Transkripts. Die ausgegebene Datei zeigt die berechnete zweidimensionale Struktur inklusive Angabe der Bindungsenergie in kcal/mol.

2.23 *Arabidopsis thaliana* als heterologe Modellpflanze zur Genfunktionsanalyse

2.23.1 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Die Keimung von *A. thaliana* Samen erfolgte entweder direkt in Erde (Compo Blumenerde) ohne vorherige Sterilisation oder auf ½ Murashige-Skoog-Medium (MS) inklusive Nährsalzen, Vitaminen und 1% (w/v) Saccharose [2,15g/l MS (Duchefa, #M0255); 10g/l Saccharose; 8g/l Agar; pH5,9 mit KOH eingestellt] mit vorheriger Sterilisation. Hierzu wurde die entsprechende Samenanzahl ($1\text{mg} \triangleq \text{ca. } 50 \text{ Samen}$) in ein Eppendorfgefäß überführt und 2min mit 1ml Ethanol sowie 10min mit 1ml Sterilisierlösung [2,825% (v/v) Natriumhypochlorid; 0,1% (v/v) Triton X-100] behandelt. Nach viermaligem Waschen mit sterilem Leitungswasser wurden die Samen in 0,1% Agarose aufgenommen.

Die Samen wurden auf dem jeweiligen Medium ausgelegt und für mindestens 72h bei 4°C im Dunkeln stratifiziert. Die MS-Platten wurden bei 24°C unter Langtagbedingungen (18h Tag/ 6h Nacht) in einem Klimaschrank (Percival) inkubiert. In Erde umgesetzte Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen bei 20°-26°C in einem Gewächshaus bis zur Samenreife kultiviert. Das eingetrocknete Pflanzenmaterial inklusive der Samenschoten wurde zwischen zwei Papierseiten zermahlen und anschließend gesiebt. Der Siebvorgang führte zur Abtrennung der Samen, so dass diese in ein Eppendorfgefäß überführt und bis zur Aussaat bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert werden konnten.

2.23.2 Transformation mittels Floral-dip-Methode

Die Floral-dip Methode zur Transformation von *A. thaliana* ist bei Clough und Bent (1998) beschrieben und wurde wie folgt durchgeführt.

In quadratischen, mit einem Nylongewebe überspannten Pflanztopfen (8x8cm) sind jeweils in die vier Ecken und die Mitte mehrere *A. thaliana* Samen ausgelegt worden. Das Nylongewebe wurde hierzu an den genannten Positionen eingeschnitten. Nach Stratifizierung und einwöchiger Kultivierung wurden die Pflanzen so pikiert, dass pro Ecke und in der Mitte 1-2 Pflanzen vorhanden waren. In einem Topf lagen somit 5-10 Pflanzen vor. Nach 3-4 Wochen Wachstum sind die ersten auftretenden Blütenstände vorsichtig mit einer Nagelschere abgeschnitten worden, um eine verstärkte Bildung sekundärer Infloreszenzen zu induzieren. Etwa fünf Tage später wurden die Pflanzen transformiert. Hierzu sind 5ml einer Vorkultur des

Agrobakterienstamms, welcher das zu transformierende T-DNA-Konstrukt (pVKH-Vektor, Kapitel 2.19) enthielt, in 250ml LB überführt und für 18h bei 28°C schüttelnd inkubiert worden. Das LB-Medium war mit den Selektionsmarkern Rifampicin (25µg/ml), Carbenicillin (100µg/ml) und Kanamycin (50µg/ml) versetzt. Rifampicin und Carbenicillin halten den Selektionsdruck auf das residente Plasmid pGV2260 im Agrobakterienstamm C58C1 aufrecht und Kanamycin selektiert auf den pVKH-Vektor. Nach Abzentrifugation der Zellen für 15min bei 5000xg, erfolgte die Aufnahme des Pellets in Infiltrationslösung [5% (w/v) Saccharose, 0,02% Silwet-L-77 (Lehle Seeds)] zu einer OD_{600nm} von ungefähr 0,8 in einem 2l Becherglas. Die oberirdischen Pflanzenteile wurden für ca. 5 Sekunden in die Infiltrationslösung getaucht und vorsichtig geschwenkt. Die Töpfe wurden in eine lichtdurchlässige Plastikhülle transferiert und für mindestens einen Tag im Gewächshaus belassen. Die Kultivierung bis zur Samenreife erfolgte im Klimaschrank ohne die Plastikhülle. Nach 6 Wochen Wachstum wurden die Samen geerntet und auf transgene Pflanzen selektiert. Die Samen wurden sterilisiert und auf ½ MS-Platten (150mm Durchmesser) mit 1% Saccharose, Cefotaxime (100µg/ml) zur Unterdrückung bakteriellen Wachstums sowie mit dem Antibiotikum (Hygromycin, 25µg/ml) für den pflanzlichen Selektionsmarker der verwendeten T-DNA ausgesät. Die selektierten Pflanzen wurden im Vier- bis Sechsstadium (2-3 Wochen nach Aussaat) in Erde umgesetzt und bis zur Samenreife im Gewächshaus kultiviert. Die geernteten Samen sind zur Prüfung auf Transgenität und zur Bestimmung der T-DNA-Loci-Anzahl mittels Segregationsanalyse auf Selektionsplatten ausgesetzt worden.

2.23.3 Segregationsanalyse

Für die Bestimmung der Anzahl unabhängig segregierender T-DNA-Loci transgener *A. thaliana* Linien wurden heterozygote F1-Pflanzen geselbstet und jeweils 50 Samen der Nachkommenschaft auf Selektionsmedium ausgelegt. Der in dieser Arbeit für die *A. thaliana* Transformation eingesetzte T-DNA Vektor pVKH-35S-pA1 vermittelt eine Hygromycinresistenz. Pflanzen ohne T-DNA-Insert weisen kein Wachstum auf. Resistente Pflanzen hingegen sind entweder homo- oder heterozygot für einen oder mehrere T-DNA-Loci. In Tabelle 15 sind die erwarteten Aufspaltungsverhältnisse für ein, zwei und drei T-DNA-Loci wiedergegeben. Mehrfachinsertionen an einem Locus sind technisch mit dieser Methode nicht

detektierbar. Die Bewertung der Ergebnisse in Form ausgezählter resistenter und sensitiver Pflanzen erfolgte über den Chi-Quadrat-Test (Kapitel 2.24.2).

Tabelle 15: Aufspaltungsverhältnisse geselbsteter heterozygoter F1 *A. thaliana* Linien in Abhängigkeit von der T-DNA-Loci-Anzahl.

Anzahl T-DNA-Loci	Resistente Pflanzen [%]	Sensitive Pflanzen [%]
1	75	25
2	93,75	6,25
3	98,4375	1,5625

2.23.4 Prüfung auf Transgenexpression in transgenen *Arabidopsis thaliana*

Von *A. thaliana* Pflanzen, die auf Selektionsmedium Wachstum aufweisen, ist Gesamt-RNA isoliert (Kapitel 2.14.1) und mittels des RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas) eine Erststrang-Synthese durchgeführt worden. In der nachfolgenden PCR wurden genspezifische Primer verwendet (Kapitel 2.7, Tabelle 1 und Tabelle 4).

2.23.5 Phänotypische Analysen

Es wurden verschiedene biochemische Methoden zur Erfassung phänotypischer Veränderungen angewandt, die jedoch keine positiven Ergebnisse erbrachten. Allerdings konnte über die Bestimmung der Blattgrößen von *A. thaliana* ein vom Wildtyp abweichender Phänotyp in einigen transgenen Linien detektiert werden. Zur Bestimmung der Blattgrößen wurden pro MS-Platte 19 Samen in definierten Abständen zueinander ausgesetzt, so dass im Vier- bis Sechsstadium keine Überlagerung der Blätter zweier Pflanzen vorlag. Die Platten wurden von einem Stativ aus jeweils in gleich bleibendem Abstand digital fotografiert. Mittels der Software "Adobe® Photoshop® Elements" wurde die Anzahl der Bildpunkte bestimmt, die die Blätter einer Pflanze besitzt. Dieser Wert stellt die aufsummierte quantifizierte Blattgröße einer Pflanze dar.

2.24 Statistische Methoden

Die Bewertung von Ergebnissen, die aus mehreren Einzelwerten einer Grundgesamtheit stammen, basiert auf statistischen Analysen. Für die in dieser Arbeit genutzten parametrischen Tests müssen zunächst Mittelwert und Standardabweichung des jeweiligen Datensatzes ermittelt werden.

Formel 1: Berechnung des arithmetischen Mittelwertes \bar{x} (Sieber, 1992)

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{mit} \quad x_i = \text{Einzelwerte; } n = \text{Anzahl der Einzelwerte } x_i$$

Formel 2: Berechnung der Standardabweichung σ (Sieber, 1992)

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{mit} \quad x_i = \text{Einzelwerte; } n = \text{Anzahl der Einzelwerte } x_i$$

$\bar{x} = \text{Mittelwert der } x_i \text{ Einzelwerte}$

2.24.1 Student's t-Test

Generelles Ziel des t-Tests in der vorliegenden Arbeit ist die Beantwortung der Frage, ob zwei Mittelwerte \bar{x}_i und \bar{x}_j einander signifikant unähnlich oder ähnlich sind. Der t-Test wird daher auch als Signifikanztest bezeichnet. Es wird überprüft, ob bestimmte Verhältnisse in Stichprobendaten wie in diesem Fall die Mittelwertunterschiede auf Zufall zurückzuführen sind oder nicht. Die angestrebte Aussage "signifikant verschieden" bedeutet demnach "nicht auf Zufall zurückführbar". Zunächst wird eine Nullhypothese H_0 und eine Alternativhypothese H_1 formuliert.

Nullhypothese $H_0: \bar{x}_i = \bar{x}_j$

Alternativhypothese $H_1: \bar{x}_i \neq \bar{x}_j$

Zur Verifizierung der Alternativhypothese, nach der die miteinander verglichenen Mittelwerte verschieden sind, wird die Stichprobenfunktion t wie folgt berechnet:

Formel 3: Berechnung von t beim Vergleich zweier Mittelwerte nach Student's t-Test
(<http://www.zoologie.sbg.ac.at/LVAMinnich/teststat.htm>)

$$|t| = \frac{\bar{x}_i - \bar{x}_j}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_i} x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^{n_i} x_i\right)^2}{n_i} + \sum_{j=1}^{n_j} x_j^2 - \frac{\left(\sum_{j=1}^{n_j} x_j\right)^2}{n_j}}{(n_i - 1) + (n_j - 1)} \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j}\right)}$$

mit $\bar{x}_i, \bar{x}_j = \text{Mittelwerte der Datensätze } x_i \text{ bzw. } x_j$

$n_i, n_j = \text{Anzahl der enthaltenen Elemente in den Datensätzen } x_i \text{ bzw. } x_j$

Mittels des Signifikanzniveaus α , welches der Konvention nach in biologischen Systemen bei 0,05 liegt (Hennig, 1995), wird die Wahrscheinlichkeit festgelegt, mit der die Alternativhypothese zu bestätigen oder zu verwerfen ist. Abhängig von der Anzahl der eingegangenen Einzelwerte (Freiheitsgrade) kann in Tabellenwerken der so genannte kritische Wert K für das Signifikanzniveau α abgelesen werden (Zar, 1984). Ist der berechnete Wert $|t| > K$, so wird H_0 verworfen und H_1 bestätigt. Demnach sind die Mittelwerte signifikant verschieden und diese Tatsache mit 95%iger Wahrscheinlichkeit ($\alpha = 0,05$) nicht auf Zufall zurückführbar.

Die oben stehende Formel 3 kann vereinfacht werden für den Fall, dass ein einzelner Messwert mit einer Gruppe von Stichprobenwerten verglichen wird und nicht wie zuvor beschrieben zwei Mittelwerte aus zwei Stichprobengruppen. Die Berechnung von t ist unten in Formel 4 aufgeführt. Die Bewertung eines statistisch zu prüfenden Ergebnisses wird wie zuvor beschrieben über die Formulierung einer Null- und einer Alternativhypothese und deren Prüfung anhand von Tabellenwerken realisiert.

Formel 4: Berechnung von t beim Vergleich von Einzel- und Mittelwert nach Student's t-Test (<http://www.zoologie.sbg.ac.at/LVAMinnich/teststat.htm>)

$$t = \frac{x_i - \bar{x}_j}{\frac{\sigma}{\sqrt{n_j}}}$$

mit x_i = Einzelwert; \bar{x}_j = Mittelwert des Datensatzes x_j
 n_j = Anzahl der enthaltenen Elemente im Datensatz x_j
 σ = Standardabweichung des Datensatzes x_j

2.24.2 Chi-Quadrat-Test (χ^2)

Für die Bewertung der Segregationsanalyse (Kapitel 2.23.3) von *A. thaliana* Nachfolgegenerationen wurde der so genannte Chi-Quadrat-Test angewandt. Dieser Test stellt ebenfalls ein statistisches Verfahren zur Ermittlung der Wahrscheinlichkeit dar, mit der experimentelle Daten den theoretisch geforderten Ergebnissen entsprechen. Selbige werden durch eine Nullhypothese wiedergegeben (Hennig, 1995), die entsprechend verifiziert oder falsifiziert wird. Berechnungsgrundlage ist die nachstehende Formel 5.

Formel 5: Berechnung χ^2 (Hennig, 1995)

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(|h_i - e_i| - 0,5)^2}{e_i} \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} k = \text{Anzahl der Klassen;} \\ h = \text{hypothetische Häufigkeit;} \\ e = \text{experimentelle Häufigkeit} \end{array}$$

Im konkreten Fall der Segregationsanalyse gehen die zwei Klassen der antibiotikaresistenten und der antibiotikasensitiven Pflanzen in die χ^2 -Berechnung ein. Die hypothetische Häufigkeit errechnet sich aus der Anzahl unabhängig segregierender T-DNA-Loci der jeweiligen transgenen Linie sowie dem Genotyp der Elterngeneration. Die experimentelle Häufigkeit entspricht den tatsächlich resistenten und sensitiven Pflanzen eines Datensatzes.

Das Signifikanzniveau α beträgt in der Biostatistik 0,05. Der kritische Signifikanzlevel χ^2_{kritisch} ist in Tabellenwerken hinterlegt (Hennig, 1995), bezogen auf die Anzahl der Freiheitsgrade und das Signifikanzniveau. Die Hypothese wird mit 95%iger Wahrscheinlichkeit bestätigt, wenn $\chi^2 < \chi^2_{\text{kritisch}}$ ist bei dem entsprechenden Freiheitsgrad und $\alpha = 0,05$. Die Anzahl der Freiheitsgrade ist um 1 geringer als die Gesamtzahl der Möglichkeiten. Im Fall der Segregationsanalyse anhand eines Antibiotikamarkers liegen die beiden Möglichkeiten resistent oder sensitiv vor, also ist die Anzahl der Freiheitsgrade = 1.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung, Isolierung und *in silico* Charakterisierung Nach-Ernte induzierter Gene der Zuckerrübe

Im Vordergrund der Analysen stand die Frage, ob sich die Ernte von Zuckerrüben auf das Genexpressionsprofil auswirkt. Unterscheidet sich also die Genexpression vor der Ernte von der Genexpression nach der Ernte und wenn ja, welche Gene sind in ihrer Expressionsstärke verändert? Zum Nachweis dieser differentiellen Genexpression wurden zwei Suppression Subtractive Hybridization Experimente durchgeführt (Kapitel 2.10). Es sind sechzehn Gene identifiziert worden, die verstärkt nach der Ernte exprimiert werden. Es lagen im pCR[®]2.1 Vektor *via* TA-Klonierung subklonierte *Rsa*I-Fragmente vor, welche diese Nach-Ernte induzierten Gene repräsentieren (Tabelle 10, Seite 20). Die Isolierung potentiell vollständiger cDNA-Klone erfolgte aus einer Plasmid cDNA-Bank (Kapitel 2.15), erstellt aus gelagertem Zuckerrübenmaterial und in einem Fall durch RACE-PCR (Kapitel 2.16). Die *in silico* Charakterisierung der Genprodukte wurde anhand verschiedener bioinformatischer Prädiktions-Tools durchgeführt (Kapitel 2.21).

Ziel der Analysen war die Klärung der möglichen Funktion Nach-Ernte induzierter Gene im Kontext des physiologischen Zustands gelagerter Zuckerrüben.

3.1.1 Die Genprodukte der Nach-Ernte induzierten Gene können anhand ihrer Homologie mit verschiedenen Stresszuständen in Verbindung gebracht werden

Um Sequenzinformationen über die Nach-Ernte induzierten Gene zu erhalten, wurde eine aus gelagertem Zuckerrübenmaterial erstellte Plasmid cDNA-Bank (Kapitel 2.15) mit den SSH-Fragmenten, welche die Nach-Ernte induzierten Gene repräsentieren, nach vollständigen cDNA-Klonen durchsucht. Die Klone mit den größten Inserts wurden sequenziert.

Für die Ableitung vollständiger Translationsprodukte ist der Erhalt von cDNA-Klonen notwendig, die mindestens das Startcodon des zugehörigen Proteins enthalten. In der Regel werden Klone erhalten, die 5' über das Startcodon hinaus eine nicht translatierte Leader-Sequenz enthalten (untranslated region, UTR). Die Nukleotidsequenz eines für ein Protein codierenden cDNA-Klons ist definiert durch das erste Methionin-Codon (ATG) eines offenen Leserasters (open reading frame,

ORF), das Stopcodon am 3'-Ende und zwei nicht translatierte Sequenzbereiche 5' des ATG bzw. 3' des Stopcodons.

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse des cDNA-Screens sowie der 5'-RACE-PCR, die im Fall des Gens *BvGLP-r* (SSH-193) Anwendung fand (Kapitel 2.16), zusammenfassend dargestellt. Es sind die Längen der gesamten cDNA ohne PolyA-Schwanz, der 5'- und 3'-UTRs und des wahrscheinlichsten Leserasters in Basenpaaren (bp) angegeben. Die Sequenzen sind im Anhang 7.2 aufgeführt. Weiterhin ist in Tabelle 16 das Gen mit der höchsten Homologie inklusive der prozentualen Identität auf Proteinebene aufgeführt. Aufgrund der Homologien wurden die Gene benannt und die entsprechenden Buchstaben sind in Tabelle 16 unterstrichen. Hierbei steht das Kürzel *Bv*, welches alle Gene tragen, für *Beta vulgaris*. Der im Fall von *BvRIP-r1*, *Bv-RIP-r2* und *BvGLP-r* verwendete Buchstabe *r* steht für root (Wurzel).

Tabelle 16: Struktur der cDNA-Klone Nach-Ernte induzierter Gene der Zuckerrübe. Spezifiziert sind die Gesamtlänge (cDNA), die 5'- und 3'-UTR-Länge sowie die Länge des längsten ORFs in Basenpaaren. Ebenfalls angegeben ist die höchste Homologie auf Proteinebene inklusive der zugehörigen Übereinstimmung in Prozent (Ident.). Da die Gene *BvNPCG1*, -2 und -3 nicht proteincodierend sind, können keine weiteren Angaben (k.A.) zu den UTR-Längen gemacht werden.

SSH-Nr.	Gen-Name	cDNA [bp]	UTR [bp]		ORF [bp]	Homologie auf Proteinebene		Ident. [%]
			5'	3' inkl. Stop		Herkunft Gen-Name (unterstrichene Zeichen)	GenBank Acc. Nr. Homolog	
7	<i>BvHSP83</i>	1286	-	236	1050	Heat shock protein 83 [<i>Ipomoea nil</i>]	AAA33748	92
20	<i>BvCPRX1</i>	1218	47	193	978	Peroxidase [<i>Spinacia oleracea</i>] Cationic peroxidase 1	CAA71489	80
153	<i>BvRIP-r1</i>	1194	51	180	963	Ribosome-inactivating Protein [<i>Spinacia oleracea</i>] Ribosome-inactivating protein root 1	BAB83507	68
292	<i>BvRIP-r2</i>	1396	230	296	870	Antiviral protein I precursor [<i>Phytolacca americana</i>] Ribosome-inactivating protein root 2	P10297	37
145	<i>BvB12D</i>	557	49	235	273	B12D Protein [<i>Ipomoea batatas</i>]	AAD22104	73
193	<i>BvGLP-r</i>	830	9	188	633	Germin-like protein Kiel 1 [<i>Beta vulgaris</i>] Germin-like protein root	AAO92348	76
266	<i>BvSP2</i>	1084	13	207	864	Chitinase-SP2 [<i>Beta vulgaris</i>]	AAA32916	99
220	<i>BvC561R</i>	1789	102	895	792	Cytochrome B561-related [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	NP_193560	44
254	<i>BvBPM1</i>	1189	44	281	864	[<i>Beta vulgaris</i>] Plasma membrane major intrinsic protein 1	AAB67868	99
132	<i>BvPSK</i>	522	93	201	228	Phyto s ulfokine- α peptide precursor [<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>]	DAA00288	55
288	<i>BvRCC</i>	1964	1	244	1719	Regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	NP_568250	54

Fortsetzung Tabelle 16:

SSH-Nr.	Gen-Name	cDNA [bp]	UTR [bp]		ORF [bp]	Homologie auf Proteinebene		Ident. [%]
			5'	3' inkl. Stop		Herkunft Gen-Name (unterstrichene Zeichen)	GenBank Acc. Nr. Homolog	
296	<i>BvMARB</i>	2035	92	227	1716	MAR-binding-protein [<i>Nicotiana tabacum</i>]	BAB41076	90
333	<i>BvWDRP</i>	1897	76	312	1509	WD-40 repeat family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	NP_175369	50
4	<i>BvNPCG1</i>	1297	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
						Non Protein coding Gene 1		
227	<i>BvNPCG2</i>	2356	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
						Non Protein coding Gene 2		
334	<i>BvNPCG3</i>	785	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
						Non Protein coding Gene 3		

Anhand der Homologien auf Proteinebene lassen sich die Gene in sechs verschiedene Klassen einteilen, wobei manche Gene mehreren Klassen zugeordnet werden können. Die Klasse 1 bilden insgesamt sieben Gene, deren Translationsprodukte eine Rolle bei Pathogenabwehr-Prozessen spielen können (*BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvB12D*, *BvRIP-r1*, *BvRIP-r2*, *BvGLP-r* und *BvSP2*). *BvHSP83* codiert ein Heat Shock Protein der HSP90 Familie, deren Bezeichnung auf das zwischen 81 und 83 kDa liegende Molekulargewicht zurückgeht. HSP-Gene können in die R-Protein vermittelte Signaltransduktion involviert sein (Schulze-Lefert, 2004). Kationische Peroxidasen (cationic peroxidase, CPRX), zu denen *BvCPRX1* zählt, fallen in die Klasse der pathogenesis related (PR) Proteine (van Loon und van Strien, 1999). Diese PR-Protein Klassifizierung kann aufgrund der Homologien auch für die Ribosomen-inaktivierenden Proteine (RIP) *BvRIP-r1* und *BvRIP-r2*, das Germin-like Protein (GLP) *BvGLP-r* und die saure Chitinase *BvSP2*, welche von Nielsen *et al.* (1994) benannt und charakterisiert wurde, vorgenommen werden. Die physiologische Funktion von *B12D*-Genen, deren Bezeichnung auf Aalen *et al.* (1994) zurückgeht und zu denen *BvB12D* hohe Homologie zeigt, ist unklar. *B12D*-Transkripte wurden aber unter anderem aus Reissuspensionskulturen isoliert, die mit pilzlichem Elicitor behandelt wurden (Huang *et al.*, 2001) und spielen somit möglicherweise bei der Pathogenabwehr eine Rolle.

Die Klasse 2 wird durch die Gene *BvCPRX1* und *BvC561R* gebildet, welche möglicherweise in die Stressantwort auf erhöhte Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) involviert sind. Kationische Peroxidasen wie *BvCPRX1* vermögen im sogenannten peroxidativen Zyklus ROS' abzubauen (Passardi *et al.*, 2005). Cytochrom-b561 Oxidasen, zu denen *BvC561R* hohe Homologie aufweist (R

steht für Related), sind wahrscheinlich an der Redoxkontrolle des ROS-abbauenden Antioxidants Ascorbat beteiligt (Asard *et al.*, 2001).

Die Klasse 3 bildet das Aquaporin-Gen *BvBPM1*, welches in die Stressantwort auf veränderte Wasserkonzentrationen involviert sein kann. Die *BvBPM1*-cDNA wurde bereits von Barone *et al.* (1997) anhand der Lokalisierung des ableitbaren wassertransportierenden Translationsprodukts in der *Beta vulgaris* Plasmamembran mit BPM bezeichnet.

Die Klasse 4 wird durch die Gene *BvPSK*, *BvRCC*, *BvMARB* und erneut *BvCPRX1* gebildet, die an der Zellantwort auf Verwundungen beteiligt sein können. *BvPSK* codiert einen Wachstumshormon-Precursor (Phytosulfokin-(PSK)- α), *BvRCC* codiert ein Protein, das an der Ausbildung des Spindelapparates beteiligt ist (regulator of chromosome condensation, RCC) und *BvMARB* codiert ein Strukturprotein der Kernmatrix (Matrix-attached-region-(MAR)-binding). Diese drei Gene sind möglicherweise an Zellteilungsreaktionen im Zuge des Wundverschlusses beteiligt. Kationische Peroxidasen wie *BvCPRX1* können eine Rolle bei der Lignifizierung während der Wundperidermbildung spielen (Passardi *et al.*, 2005).

Das bereits im Rahmen der Pathogenantwort aufgeführte Gen *BvB12D* bildet die Klasse 5 der Seneszenz assoziierten Gene (SAG). Auch wenn die physiologische Funktion der *B12D*-Gene unbekannt ist, werden sie nach Huang *et al.* (2001) aufgrund der Induktion im Zuge der Blattseneszenz zu den SAGs gezählt.

In die Klasse 6 fallen die vier Gene *BvWDRP*, *BvNPCG1*, *BvNPCG2*, und *BvNPCG3*, die keiner der fünf anderen Klassen zugeordnet werden können und deren Funktion unbekannt ist. *BvWDRP* codiert ein unbekanntes Protein, das Wiederholungen von WD40-Strukturdomänen aufweist (WD40-family repeat Protein, WDRP). *BvNPCG1*, *BvNPCG2*, und *BvNPCG3* sind wahrscheinlich nicht proteincodierend (Non Proteinencoding Gene, NPCG), da keine längeren durchgehenden Leseraster mit einem Start-ATG detektiert wurden.

3.1.2 Charakterisierung der Translationsprodukte Nach-Ernte induzierter Gene auf *in silico* Ebene

Die Analyse von Proteinen mittels bioinformatischer Prädiktions-Tools ermöglicht nähere Aussagen über ihre Funktion *in vivo*. Anhand von Homologievergleichen mit bekannten Proteinen ist häufig eine Aussage über die Proteinfunktion möglich, wie in Kapitel 3.1.1 gezeigt. Es muss dennoch geklärt werden, ob einige Details zwischen

Homolog und zu untersuchendem Protein tatsächlich übereinstimmen. So kann die Angabe der Proteinlokalisierung in der Zelle zum Beispiel über die Identifizierung möglicher Signalpeptide erfolgen. Die Zugehörigkeit einiger Proteine zu definierten Klassen wird zum Teil über die Bestimmung des Molekulargewichts und den isoelektrischen Punkt (pI) ermöglicht. In den nachstehenden Kapiteln sind von einigen ausgewählten Proteinen der Nach-Ernte induzierten Gene die Ergebnisse solch funktionsklärender Analysen dargestellt, sofern sie eine programmgegebene signifikante Aussagewahrscheinlichkeit besitzen. Ob die auf diese Weise vorhergesagte Funktion eines Proteins auch *in vivo* vorliegt, muss letztlich durch geeignete Versuche experimentell geklärt werden. Die Bioinformatik dient hierbei als richtungsgebender Schritt bei der Auswahl der Experimente.

3.1.2.1 Die Peroxidase BvCPRX1 zählt zu den kationischen Peroxidasen und weist ein N-terminales Signalpeptid auf

Peroxidasen der Klasse III können in kationische und anionische Isoformen eingeteilt werden. Die pI-Analyse mittels des Tools ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) ergibt für die Peroxidase BvCPRX1 einen Wert von 8,98. Demnach zählt das Protein zu den kationischen Peroxidasen. Diese Einordnung lässt sich durch den höheren Anteil basischer Aminosäuren von 12,5 % (41/326) gegenüber dem saurer Aminosäuren von 9,8 % (32/326) erklären. In Abbildung 7 sind alle basischen Aminosäuren grau hinterlegt. Weiterhin besitzt die Peroxidase BvCPRX1 laut einer PSORT-Analyse (Nakai und Kanehisa, 1991) ein spaltbares N-terminales Signalpeptid, durch welches das Protein in den sekretorischen Pathway eingeschleust wird, dieses ist in Abbildung 7 unterstrichen dargestellt. Die vorhergesagte Schnittstelle liegt zwischen Aminosäure G25 und Q26. Die Proteinlokalisierung läge demnach außerhalb der Zelle im apoplastischen Raum.

1-	MRETSFSFVL	FLGLVLITLV	GHCYQLKVG	FYEGKCGKND	VEKVIHEVVK	- 50
51-	<u>KKITKDPDTV</u>	SDLVRLSFHD	CFVRGCDGSI	LLDGANTEQK	APINLALGGF	-100
101-	EVVKDIKEAI	EKACPGVVSC	TDVIVIGARS	AISSAGGKWF	EVETGRRDGV	-150
151-	VSLKSEAQAN	IPPPTMPVSQ	AIQLFAKKGL	NKDDFVLLG	GHTVGTSKCH	-200
201-	SFKERLYNFR	NTKKPDPTIS	SSLLPLLKKT	CPLNSKIDNE	TFLDQTPNSH	-250
251-	FKIDNAYYKQ	ILAHNGVLEI	DSNLASNPQT	RGLVKGLAYN	PNKFLNQFGP	-300
301-	AMVKMARIGV	LTGCHGEIRK	TCSSVN			-326

Abbildung 7: Designiertes Translationsprodukt des Gens *BvCPRX1*. Das spaltbare N-terminale Signalpeptid ist unterstrichen; basische Aminosäuren sind grau unterlegt.

3.1.2.2 Die Ribosomen inaktivierenden Proteine BvRIP-r1 und BvRIP-r2 weisen N-terminale Signalpeptide auf

Ribosomen inaktivierende Proteine des Typs I, zu denen die Translationsprodukte der Nach-Ernte induzierten Gene *BvRIP-r1* und *BvRIP-r2* zählen, können verschiedene Zelllokalisierungen aufweisen. BvRIP-r1 besitzt laut PSORT-Analyse (Nakai und Kanehisa, 1991) ein nicht spaltbares N-terminales Signalpeptid bis Position T26. Das Protein ist vermutlich in der Plasmamembran oder der Membran des Endoplasmatischen Reticulums lokalisiert.

BvRIP-r2 weist ebenfalls ein N-terminales Signalpeptid auf, welches hingegen spaltbar ist und das Protein in den sekretorischen Pathway einschleust. Die Schnittstelle liegt zwischen Aminosäure A17 und I18. In Abbildung 8 und 9 sind die ableitbaren Translationsprodukte der Gene *BvRIP-r1* und *BvRIP-r2* gezeigt, das Signalpeptid ist jeweils unterstrichen.

1-	<u>MKALTAARWI</u>	<u>QWCIIMVVVI</u>	<u>VPITATTTED</u>	<u>EAVGKKLSYT</u>	<u>TVTTFELKYGV</u>	- 50
51-	<u>EPLKGYSSFL</u>	<u>TRLRनावेAP</u>	<u>TRACGLQFTR</u>	<u>KVPLTGKQYV</u>	<u>LVDLKFSNTQ</u>	-100
101-	<u>WVTLGIDAKD</u>	<u>LYVWAYQDNV</u>	<u>KYNGKFRANF</u>	<u>LGDAPQSAKN</u>	<u>SLFPGSTKRT</u>	-150
151-	<u>TRFGGNYNLS</u>	<u>EPAAGVTRNN</u>	<u>IVLGTQNLDG</u>	<u>AIKRVYGKQE</u>	<u>GVLNQGKDEA</u>	-200
201-	<u>KFFLIAIQMV</u>	<u>AEAARFKFME</u>	<u>QGIVKGDKTT</u>	<u>AFKAKMVAFQ</u>	<u>NDWDPISQAI</u>	-250
251-	<u>HRAEAAARKC</u>	<u>TTISPTLVIS</u>	<u>NTGYRQEVNR</u>	<u>VDAVKNDMGL</u>	<u>LKYKSIGSSV</u>	-300
301-	<u>VNSILADDGG</u>	<u>SSLEFLES</u>	<u>AV L</u>			-321

Abbildung 8: Designiertes Translationsprodukt des Gens *BvRIP-r1*. Das nicht spaltbare N-terminale Signalpeptid ist unterstrichen.

1-	<u>MTNCFLVVVL</u>	<u>AIWIVPAIVP</u>	<u>TKASDVSLNL</u>	<u>LTADESDFSR</u>	<u>FLTEMRVNLT</u>	- 50
51-	<u>DPNISYGGTH</u>	<u>LPVMAASTNF</u>	<u>ILVDLEFEKG</u>	<u>TMTLAFRRSD</u>	<u>LYLEGYLDQI</u>	-100
101-	<u>GGNYRAHFFL</u>	<u>DASPEGKASL</u>	<u>FPNARGANNR</u>	<u>IIMFYKGSYP</u>	<u>DIEKVAKDRS</u>	-150
151-	<u>KISLGIYELR</u>	<u>KLMIQVYGQS</u>	<u>KVDVPTEAKL</u>	<u>MLLFIQMISE</u>	<u>AARFKYIENK</u>	-200
201-	<u>ILETFYMSFK</u>	<u>PDPKILKLET</u>	<u>SWQAITVGIR</u>	<u>NSRNGVISPA</u>	<u>LKLDDVNGRD</u>	-250
251-	<u>WIVSRVQDIV</u>	<u>DDMALLKYEG</u>	<u>PSTTFISLVG</u>	<u>NNNGGDHAKI</u>		-290

Abbildung 9: Designiertes Translationsprodukt des Gens *BvRIP-r2*. Das spaltbare N-terminale Signalpeptid ist unterstrichen.

3.1.2.3 Das Germin-like Protein BvGLP-r wird vermutlich sekretiert

Die Klassen der Germine und die zu diesen hoch homologen Germin-like Proteine sind gekennzeichnet durch konservierte Bereiche (Bernier und Berna, 2001), die auch im BvGLP-r vorliegen. Anhand einer PSORT-Analyse (Nakai und Kanehisa, 1991) wurde ein spaltbares N-terminales Signalpeptid bis Position A19 detektiert, welches in Abbildung 10 durch Unterstreichung hervorgehoben ist. In den für GLPs

charakteristischen A, B und C-Domänen (Bernier und Berna, 2001) sind die hoch konservierten Aminosäuren C26, C41 sowie H104, H106, E110 und H149 auch im BvGLP-r vorhanden. Gleiches gilt für die KGD-Domäne (Abbildung 10, fett und unterstrichen), welche an der Weiterleitung extrazellulärer Signale ins Zellinnere beteiligt sein kann und nur in GLPs aber nicht in Germinen auftritt. Der theoretische isoelektrische Punkt von BvGLP-r liegt laut ProtParam-Analyse (Gasteiger *et al.*, 2005) bei 5,46.

1-	MDALKIVFLF	ALLVPLSSAT	LVVDYCVADF	NFPVGPAGYP	CKNPATLTAD	- 50
51-	DFVFSGLGVA	ANSTTTPFNA	SSVFAVDVTF	PALNGLGLSI	GRLDIGVGGA	-100
101-	VPI <u>HSHRASE</u>	VILVSEGTII	AGFIDTNNTA	YYKTLN <u>KGDI</u>	MIFPPTLLHF	-150
151-	QVNVGKSPAL	AYVTLSASP	GFEITTFALA	GNDFPSDLIQ	KITLVDTAQV	-200
201-	KKLKRIFGGT	N				-211

Abbildung 10: Designiertes Translationsprodukt des Gens *BvGLP-r*. Das spaltbare N-terminale Signalpeptid ist unterstrichen, die entlang der GLP-Familie konservierten Aminosäuren sind fett gedruckt. Die KGD-Domäne ist fett und unterstrichen.

3.1.2.4 Das integrale Membranprotein BvBPM1 zählt zur Klasse der intrinsischen Plasmamembran Proteine (PIP)

Das mRNA-Transkript des Gens *BvBPM1* (Bezeichnung laut Barone *et al.*, 1997) wurde bereits von Qi *et al.* (1996) aus *Beta vulgaris* L. (Rote Beete) isoliert. Das ableitbare Translationsprodukt wurde aber bisher nicht charakterisiert.

1-	MTKDVEAVSE	QQQPEFSTKD	YHDPAPLI	DMEELKKWSF	YRAIIAEFVA	- 50
51-	<u>TLLFLYVTVL</u>	<u>TVIGHFRSAD</u>	<u>LENGGENCTG</u>	<u>VGILGIAWAF</u>	<u>GGMIFILVYC</u>	-100
101-	<u>TAGISGGHIN</u>	<u>PAVTIGLFLA</u>	<u>RKVSLIRALA</u>	<u>YMVAQCLGAI</u>	<u>CGVGPFVKAFQ</u>	-150
151-	<u>SAYYDRYGGG</u>	<u>ANQMSHGYNK</u>	<u>GTGLGAEIIG</u>	<u>TFVLVYTVFA</u>	<u>ATDPKRSARD</u>	-200
201-	<u>SHVPVLAPLP</u>	<u>IGFAVFMVHL</u>	<u>ATIPITGTGI</u>	<u>NPARSFGAAV</u>	<u>IFNEEKSWNE</u>	-250
251-	<u>HWIFWVGPFV</u>	<u>GAAIAAFYHQ</u>	YILRAGAIKA	LGSFRSSA		-288

Abbildung 11: Designiertes Translationsprodukt des Gens *BvBPM1*. Plasmamembranständige Aminosäuren sind fett gedruckt, ins Cytosol ragende Schleifen unterstrichen und extrazelluläre Schleifen grau hinterlegt.

Integrale Membranproteine, die primär Wassermoleküle transportieren, werden häufig vereinfacht als Aquaporine bezeichnet. Phylogenetisch werden Aquaporine in verschiedene Familien unterteilt (Zardoya und Villalba, 2001), eine dieser Transportfamilien stellen die "major intrinsic proteins" (MIPs) dar, zu denen auch die Plasmamembran Proteine (PIPs) zählen. Diese sind charakterisiert durch sechs hydrophobe transmembrane Helices verbunden durch fünf hydrophile Schleifen.

Zwei dieser fünf Schleifen ragen in das Cytosol, drei liegen auf der apoplastischen Seite (Barone *et al.*, 1997). Mittels des Programms TMPred (Hofmann und Stoffel, 1993) wurde diese Transmembranstruktur auch im ableitbaren Translationsprodukt des Gens *BvBPM1* gezeigt (Abbildung 11).

3.1.2.5 Die Chitinase BvSP2 trägt ein N-terminales Signalpeptid

Die Chitinase BvSP2 und deren zugehörige cDNA wurden bereits von Nielsen *et al.* (1994) aus der Zuckerrübe isoliert und charakterisiert.

Chitinasen gehören zur Familie 18 und 19 der Superfamilie der O-Glycosyl-Hydrolasen, sie spalten die β -1,4-N-acetyl-D-Glucosamin Verknüpfungen in Chitin-Polymeren (Brameld und Goddard, 1998).

Die Chitinase BvSP2 weist bis zur Aminosäure A27 laut PSORT-Analyse (Nakai und Kanehisa, 1991) ein spaltbares N-terminales Signalpeptid auf, welches das Enzym vermutlich in den sekretorischen Pathway einschleust (Abbildung 12). Der mittels ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) ermittelte pI liegt bei 5,0 und klassifiziert das Enzym somit als saure Chitinase.

1-	<u>MALLLKNTLY</u>	IALIISVISS	FPTS L FAQNC	GCAPNLCCSN	FGFCGTGTPY	- 50
51-	CGVGNCQSGP	CEGGTPTTPT	TPTTPTTPGT	GGGGSSVSDI	VSQAFFDGII	-100
101-	GQAAASCPGK	NFYTRAAFLS	AVDPKFGNEG	SSDDNKREIA	AFFAHISHET	-150
151-	TNLCHIEERD	GDVGDAYCDQ	DKAAQYPCAA	GKKYYGRGPL	QLSWNNYNYAL	-200
201-	AGQAIGFDGL	GNPEKVATDV	NTSFKAAMWF	WMTNVHSVMN	QGFGATTKAI	-250
251-	NGALECNGQN	QDQANDRIQF	YKKYCADFGV	APGDNLTC		-288

Abbildung 12: Designiertes Translationsprodukt des Gens *BvSP2*. Das spaltbare N-terminale Signalpeptid ist unterstrichen dargestellt.

3.1.2.6 Der Phytosulfokin- α -Precursor BvPSK weist neben einem N-terminalen Signalpeptid weitere charakteristische Merkmale auf

Die aktive Form des Peptidwachstumshormons PSK- α wird durch mehrere Prozessierungsschritte aus einem Precursor-Protein gebildet. Das wachstumsstimulierende Molekül ist ein sulfatiertes Pentapeptid. Das PSK- α -Precursor-Protein BvPSK zeichnet sich durch ein N-terminales spaltbares Signalpeptid aus, welches in der Primärsequenz bis Position T19 reicht (Abbildung 13). Lorbiecke und Sauter (2002) haben durch Homologievergleiche gezeigt, dass entlang von PSK- α -Precursor-Proteinen ein konserviertes Modul folgender Struktur ableitbar ist: Cx(4-9)[E/D/Q]xCx(2)RRx(3-4)AH[T/L/V]DYIYTQ. Die Primärsequenz

des PSK- α -Precursors BvPSK gibt dieses Modul wieder, welches in Abbildung 13 fett gedruckt dargestellt ist.

1-	MSKFTLLII	VMLVCFASTE	TCVARTIPAF	HHEDMDFENL	KVDDNKSCQG	- 50
51-	VNE EECLMRR	TLV AHTDYIY	TQ HQNP			-100

Abbildung 13: Designiertes Translationsprodukt des Gens *BvPSK*. Das spaltbare N-terminale Signalpeptid ist unterstrichen dargestellt, die entlang der PSK- α -Precursor-Familie konservierten Aminosäuren sind fett gedruckt, das fünf Aminosäuren umfassende Prozessierungs-Produkt ist grau hinterlegt.

3.1.2.7 Das Cytochrom-b561-Protein BvC561R ist vermutlich in der Plasmamembran lokalisiert

Auch wenn die exakte physiologische Funktion von Cytochrom-b561-Proteinen ungeklärt ist, so weisen die ubiquitär in Pflanzen vorkommenden Proteine als Gemeinsamkeit die subzelluläre Lokalisierung in Membranen auf (Asard *et al.*, 2001). *In silico* Lokalisierungsanalysen mittels der Programme PSORT (Nakai und Kanehisa, 1991) und Tmpred (Hofmann und Stoffel, 1993) zeigen für das Translationsprodukt des Gens *BvC561R* ebenfalls eine Plasmamembranständigkeit (Abbildung 14).

1-	MVSWKSITFL	ALSLIIHVPF	ASCSSLKEAV	PAFSHIKDKN	HSADQLSSKM	- 50
51-	<u>TYE</u> VRLHGLL	LWASMGFLMP	IGILIIRLSS	REECGTRLKL	YFYLHLFLQM	-100
101-	LSLSIATAGA	IKSIKTFENS	FSNNHQKIGL	ALYGAIWVQA	VIGFCRPHRG	-150
151-	<u>TSKRSLWYFL</u>	HWVFGTIICI	VGILNIYGTI	EAYKKRTKRS	TTLWTILEFTV	-200
201-	EISSIAFLYL	FQDKRDYLQK	QGVYIREGGQ	VRPSNDQESS	LRDNQKDLWK	-250
251-	EPCPKVNALK	NLFN				-264

Abbildung 14: Designiertes Translationsprodukt des Gens *BvC561R*. Plasmamembranständige Aminosäuren sind fett gedruckt, ins Cytosol ragende Schleifen unterstrichen und extrazelluläre Schleifen grau hinterlegt.

3.1.2.8 Das Translationsprodukt des Gens *BvMARB* ist wahrscheinlich nukleär lokalisiert

BvMARB codiert für ein Matrix-attached-region-(MAR)-binding-Protein. Das ableitbare Translationsprodukt beinhaltet laut PSORT-Analyse (Nakai und Kanehisa, 1991) Kernlokalisierungssignale in Form 4-5facher Wiederholungen basischer Aminosäuren wie Lysin (K) oder Arginin (R), diese sind in Abbildung 15 fett gedruckt. Zudem weist das MAR-binding-Protein BvMARB eine NOP-(Nucleolar protein)-Domäne auf, welche von so genannten snoRNAs (small nucleolar RNAs) gebunden

wird. Proteine, die eine NOP-Domäne aufweisen, sind zum Beispiel an der Ribosomen-Synthese beteiligt (Gautier *et al.*, 1997).

1-	MLVLFETPAG	FALFKVLDEG	KLSQIEDLWK	EFTSVDSARK	VVKLKAFDKF	- 50
51-	ENTAEALSAA	TLLIDSKPSK	GLRKFLKAHC	KGETLAVADS	KLGNAIKEKL	-100
101-	QIECVHNSV	MELMRGVRSQ	LSELISGLGA	QDLAPMSLGL	SHSLSRYYKLK	-150
151-	FSPEKVDTMI	IQAIGLLDDL	DKELNTYAMR	VREWYGWHFP	ELSKIVQDNI	-200
201-	LYAKAVKLMG	NRVNAAKLDF	SEVLPEEVET	GLKEAAMISM	GTEVSDLDLL	-250
251-	NIKELCDQVL	SLAEYRAQLY	DYLKSRMNTI	APNLTALVGE	LVGARLIAHG	-300
301-	<u>GSLINLAKQP</u>	<u>GSTVQILGAE</u>	<u>KALFRALKTK</u>	<u>HATPKYGLIY</u>	<u>HASLIGQAAP</u>	-350
351-	<u>KHKGKISRSL</u>	<u>AAKTALAIRY</u>	<u>DALGDNPDNT</u>	<u>MGLENRAKLE</u>	<u>ARLRNLEGKE</u>	-400
401-	LGRSAGSAKG	KPQIEVYDKD	HKKGAGALIT	AAKTYNPAAD	SILGKKDGNL	-450
451-	MRIETNVdle	EETKKAKKEK	KEKKKGSVVE	NGVANGGDEN	VEPEDEKTAK	-500
501-	KE KKKKK QLT	ENGDKIEEPE	TGKKE KKKKK	QAETEDNEEA	GVKD KKKKRK	-550
551-	HADADEEAEP	VSEKKE KKKK	KK			-572

Abbildung 15: Designiertes Translationsprodukt des Gens *BvMARB*. Die Kernlokalisierungssequenzen sind fett gedruckt. Die NOP-Domäne ist unterstrichen dargestellt.

3.1.2.9 Ein theoretisches Translationsprodukt des Gens *BvNPCG1* weist eine Spleißosom-ähnliche Peptidsequenz auf

Obwohl *BvNPCG1* als "Non Protein coding Gene" definiert wurde, lässt sich aus der isolierten cDNA von Nukleotid 584 bis 730 ein Protein translatieren (Aminosäuren 194-243), das nur in diesem Bereich zu 89% mit einem Segment des C-Terminus eines Spleißosom-ähnlichen Proteins aus *A. thaliana* (CAB75756) übereinstimmt. Das hypothetische Translationsprodukt weist kein Start-ATG auf und die translatierte Sequenz umfasst lediglich 147bp bei einer cDNA-Länge von 2356bp. Sowohl in den theoretischen Leserastern 5' als auch 3' des translatierbaren Bereichs sind keine signifikanten Homologien zu detektieren.

<i>BvNPCG1</i> :	194-	SFHYCKYRRD	EN*LYIFSDG	VYPRWLTASH	HVDFDTMAGA	- 234
		SFHYCKYRRD	EN LYIF D	PRWLTASH	HVDFDTMAGA	
Spleiß :	1006-	SFHYCKYRRD	ENQLYIFADD	CVPRWLTASH	HVDFDTMAGA	-1045
<i>BvNPCG1</i> :	235-	DKFGNVYFV				- 243

Abbildung 16: Homologievergleich zwischen einem möglichen Translationsprodukt des Gens *BvNPCG1* und einem Spleißosom-ähnlichen Protein aus *A. thaliana* (Spleiß). Identische Aminosäuren sind fett gedruckt.

Zudem sind alle drei Leseraster mit zahlreichen Stopcodons versehen, eines davon liegt auch in dem Homologie zeigenden Bereich beginnend bei Nukleotid 620, in Abbildung 16 ist dieses durch einen Stern gezeigt. Im zugehörigen Translationsprodukt des Homologs befindet sich an dieser Position die Aminosäure Glutamin.

3.1.2.10 Das nicht proteincodierende Transkript des Gens *BvNPCG3* enthält eine potentielle miRNA-Vorläufer Sekundärstruktur

Der in Tabelle 16 (Kapitel 3.1.1, Seite 50) spezifizierte cDNA-Klon *BvNPCG3* enthält ein 116 bp langes nach der GT-AG-Regel (Lewin, 1998) spleißbares Intron von Position 259 bis 374. Das Intron wurde identifiziert über eine vergleichende Sequenzanalyse des mittels der SSH-Methode erhaltenen cDNA-Fragments, das kein Intron enthält und dem isolierten, intronhaltigen cDNA-Klon (Daten nicht gezeigt). Mithilfe des RNA-Sekundärstruktur-Prädiktionsprogramms RNAstructure (Mathews, 2004) wurde die in Abbildung 17 gezeigte Haarnadelstruktur identifiziert. Selbige erfüllt die Kriterien für pre-miRNA Strukturen nach Lindow und Krogh (2005), welche bei der Haarnadelstrukturausbildung mindestens 16 gepaarte Basen und eine Bindungsenergie kleiner -60 kcal/mol vorsehen.

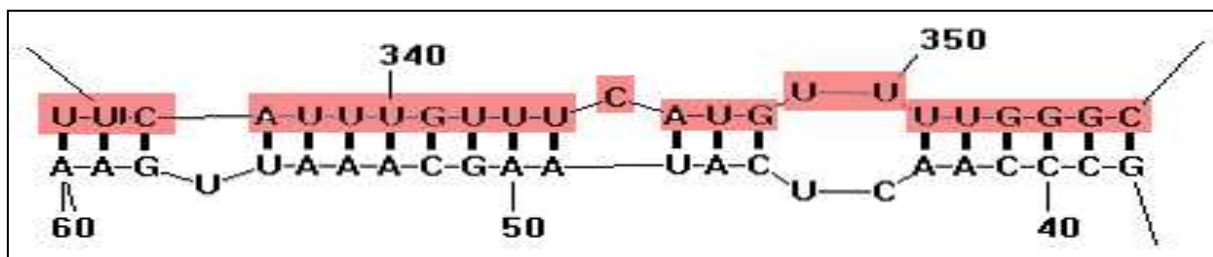


Abbildung 17: RNA-Sekundärstruktur innerhalb des Gens *BvNPCG3*, die potentiell eine Vorläufer Haarnadelstruktur für ein miRNA-Molekül darstellt. Die Bindungsenergie beläuft sich auf -19,3 kcal/mol. Der rot hinterlegte Sequenzbereich ist in einem Intron lokalisiert.

Die Haarnadelstruktur entsteht durch komplementäre Basenpaarung zwischen Nukleotid 38-60 (5'-GCCCAACTCATAAGCAAATTGAA-3') und Nukleotid 334-356 (5'-TTCATTTGTTTCATGTTTTGGGC-3') der cDNA, wobei der zuletzt genannte Sequenzabschnitt im Intron liegt.

Ein BLAST-Vergleich der beiden Sequenzabschnitte mit dem *A. thaliana* Genom in der TAIR-Datenbank liefert mehr als 100 Homologien, die in mindestens 14 Nukleotiden mit der Ausgangssequenz von 23 Nukleotiden übereinstimmen (Daten

nicht gezeigt). Für eine erfolgreiche Bindung an das Zieltranskript muss eine miRNA antisense orientiert sein. Unter Einbeziehung der Sequenzorientierung sind in Tabelle 17 vier potentielle Zielgene aufgeführt, die in mindestens 15 Nukleotiden zu 100% mit einer der beiden miRNAs (gekennzeichnet als Intron bzw. 'Exon') übereinstimmen. Ferner ist die Homologie der Zielgene und der miRNA-Zielort im Transkript angegeben (Exon, Intron oder UTR).

Tabelle 17: Ergebnis einer TAIR-Datenbanksuche nach möglichen Zielgenen der potentiellen miRNAs des Gens *BvNPCG3*. In der jeweils ersten Zeile der Sequenzhomologie-Spalte ist die miRNA-Sequenz angegeben, darunter zum direkten Vergleich die Zielsequenz in identischer Orientierung.

miRNA Herkunft	Locus-Nr.	Funktion des Homologs	miRNA Zielort	Identität	Sequenzhomologie
Intron	At1g75540	zinc finger (B-box type)	Exon	15/23	1 TTCATTTGTTTCATGTTTTGGGC 23 896 CCTTGTTGTTTCATGTTTTGTAT 874
Intron	At1g04490	expressed protein	Exon	17/23	1 TTCATTTGTTTCATGTTTTGGGC 23 1068 TCCTGTTGTTTCATGTTTTGACC 1046
Intron	At4g09960	MADS-box protein (AGL11)	Intron	16/23	1 TTCATTTGTTTCATGTTTTGGGC 23 2931 GAATTTTGTTTCATGTTTTGTCA 2909
'Exon'	At5g24440	RNA-binding protein	Intron	18/23	1 GCCCAACTCATAAGCAAATTGAA 23 1052 TCTCAACTCATAAGAAAATTGGC 1030

Davon ausgehend, dass die in Tabelle 17 gezeigten *A. thaliana* Homologe auch den Zielgenen in *B. vulgaris* entsprechen und diese konserviert sind, erfüllt die postulierte miRNA die von Schwab *et al.* (2005) aufgestellten empirischen Regeln für die miRNA-Zieltranskript Bindung nicht. Zum Beispiel erfüllt kein miRNA-Zieltranskript-Paar das Kriterium, nach welchem maximal ein Mismatch zwischen Nukleotidposition 2 und 12 im miRNA-Zieltranskript-Paar vorliegen darf. Alle in Tabelle 17 aufgeführten Paare weisen mindestens zwei Mismatches in diesem Sequenzbereich auf. Ferner fehlt zur Annotation der vorhergesagten miRNA nach Ambros *et al.* (2003) deren experimenteller Nachweis zum Beispiel durch Hybridisierung in einem Northern-Blot.

3.2 Die Expressionsprofile der Nach-Ernte induzierten Gene sind heterogen und in Klassen einteilbar

Um genauere Aussagen über die Funktionen von Genprodukten machen zu können, muss ermittelt werden, wann, wo und unter welchen Bedingungen die Gene exprimiert werden. Anhand der Ergebnisse kann ferner die Eignung Nach-Ernte induzierbarer Promotoren für biotechnologische Zwecke beurteilt werden.

Es wurden semiquantitative RT-PCRs durchgeführt, um zu klären, zu welchen Zeitpunkten die Nach-Ernte induzierten Gene unter kontrollierten Lagerbedingungen, in der Feldmiete und eventuell auch schon während des Zuckerrübenwachstums transkribiert werden. Anhand der Ergebnisse wurde eine Klassifizierung nach ähnlichen Expressionsprofilen vorgenommen.

Die Authentizität der Amplifikate konnte anhand der PCR-Fragmentlänge bestätigt werden. Diese ist durch die bekannten Sequenzen der SSH-Fragmente wie auch der zugehörigen cDNA-Klone vorhersagbar (Tabelle 10, Seite 20). In allen Fällen wurden die genspezifischen Amplifikatlängen erhalten. Im Fall von *BvWDRP* wurde die korrekte Amplifikatlänge nur anhand der SSH-Fragmentsequenz identifiziert. Der isolierte cDNA-Klon ist aufgrund einer alternativen Polyadenylierungsstelle am 3'-Ende 110bp kürzer als das SSH-Fragment und weist daher nur eine der beiden Primerbindungsstellen auf (Anhang 7.2).

Um Aussagen zur Expressionskinetik eines Gens zu machen, müssen bei der RT-PCR vergleichbare Template-Mengen eingesetzt werden. Daher wurde als Amplifikationskontrolle Transkript des GAPDH-Gens als Referenz nachgewiesen (Kapitel 2.14.4). Der Nachweis erfolgte in einem getrennten Ansatz zu jeder durchgeführten PCR, wobei das Ergebnis nachfolgend nur jeweils einmal für das Material aus kontrollierten Lagerungsbedingungen, für Material aus der Feldmiete und Material aus sich entwickelnden Zuckerrüben gezeigt ist (Abbildung 18, 19 und 20).

Durch semiquantitative RT-PCRs wird letztlich nur die Amplifizierbarkeit eines mRNA-Transkripts wiedergegeben. Um die Amplifizierbarkeit der verschiedenen Gene untereinander vergleichen zu können, wurden die Primerpaare für alle nachzuweisenden Transkripte so konzipiert, dass ähnliche Schmelztemperaturen vorlagen und Amplifikate zwischen 200bp und 400bp resultierten. Da stets identische PCR-Bedingungen gewählt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass auch die Amplifizierbarkeit ähnlich ist. Daher wird im Folgenden indirekt von der

Amplifikationsfähigkeit eines Transkripts auf die Höhe des vorliegenden Transkriptlevels geschlossen.

3.2.1 Expressionsprofile der fünf spät induzierten Gene *BvNPCG1*, *BvB12D*, *BvGLP-r*, *BvSP2* und *BvWDRP*

Die in diesem Kapitel in ihren Expressionsprofilen beschriebenen Gene zeichnen sich durch eine Transkriptionsinduktion zum Ende der Lagerungsperiode aus. In Abbildung 18 sind die Expressionsprofile der spät induzierten Gene unter kontrollierten Lagerbedingungen aufgeführt. Bei keinem der Gene ist Transkript in der reifen Rübe direkt vor der Ernte detektierbar (Spur 0W). Im Gegensatz zu den anderen Genen wird *BvSP2* auch im Blatt transkribiert (Spur 0B). Bei diesem Gen ist bereits nach drei Tagen Lagerung Transkript nachweisbar, der Transkriptlevel steigt an und hat sein höchstes Niveau nach 46 Tagen Lagerung.

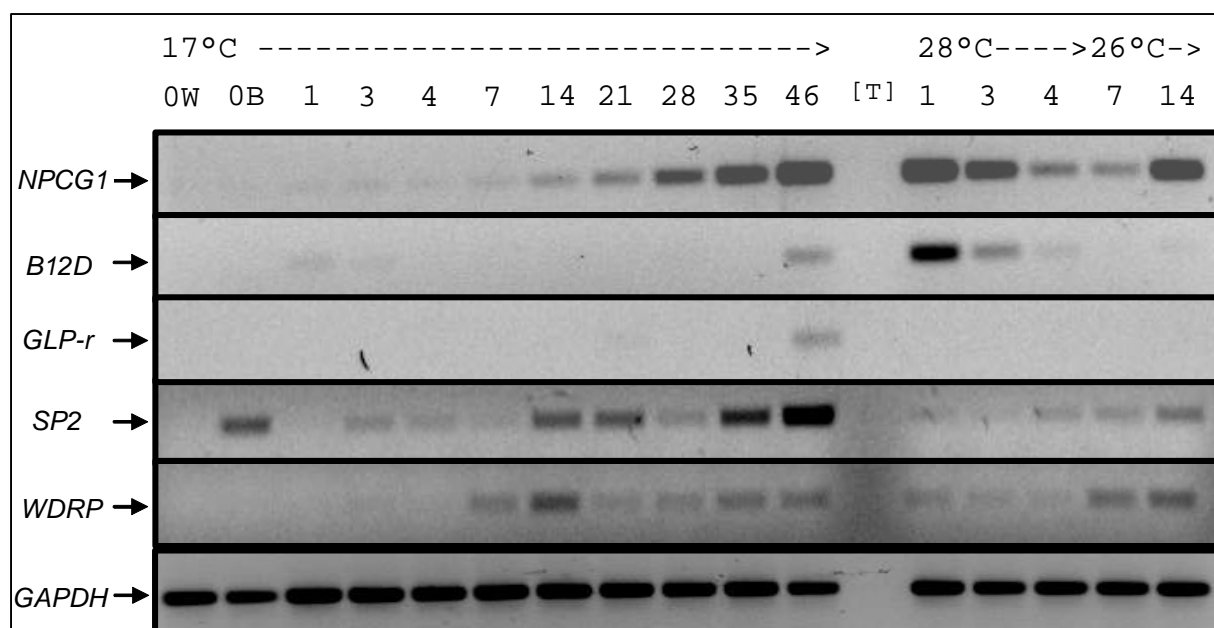


Abbildung 18: Agarosegelfoto einer semiquantitativen RT-PCR der fünf spät induzierten Gene *BvNPCG1*, *BvB12D*, *BvGLP-r*, *BvSP2* und *BvWDRP*. Als Template fungierte PolyA⁺ mRNA kontrolliert gelagerter Zuckerrüben. Als Ladekontrolle wurde Transkript des GAPDH-Gens nachgewiesen.

Ähnlich verhält sich der Transkriptlevel von *BvNPCG1*, der ab dem siebten Tag der Lagerung schwach detektierbar ist und einer anschließenden kontinuierlichen Induktion unterliegt. Bei zusätzlichem Stress durch Erhöhung der Lagerungstemperatur auf 28°C wird *BvNPCG1* verstärkt transkribiert. Der nach 46

Tagen erreichte Transkriptlevel gibt die höchste in diesem Versuchsteil detektierte Bandenstärke aller Nach-Ernte induzierten Gene wieder.

Das Gen *BvWDRP*, dessen Translationsprodukt durch mehrere WD40-Domänen charakterisiert ist, wird nach ca. sieben Tagen Lagerung induziert und bis zum letzten erfassten Zeitpunkt in vergleichbarer Stärke transkribiert. Die für das B12D-Protein und das Germin-like Protein codierenden Gene *BvB12D* und *BvGLP-r* weisen erst nach 46 Tagen Lagerung Transkript in nachweisbarer Stärke auf, *BvB12D* wird auch in den ersten Tagen nach der Ernte sehr schwach transkribiert und zeigt eine Induktion bei erhöhter Lagerungstemperatur.

In der Feldmiete zeigen die beschriebenen fünf Gene voneinander abweichende Expressionsprofile. Abbildung 19 zeigt die RT-PCR-Ergebnisse, die anhand feldgelagerten Materials ermittelt wurden.

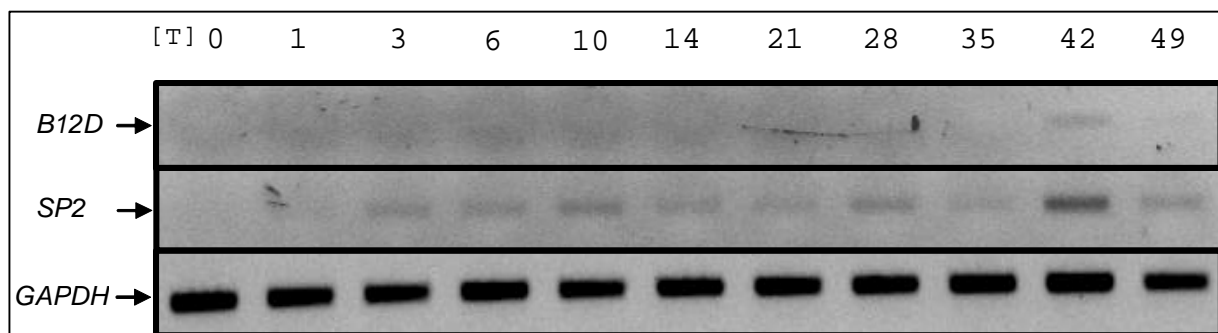


Abbildung 19: Agarosegelfoto einer semiquantitativen RT-PCR der spät induzierten Gene *BvB12D* und *BvSP2*. Als Template fungierte PolyA⁺ mRNA feldgelagerter Zuckerrüben. Als Ladekontrolle wurde Transkript des GAPDH-Gens nachgewiesen.

Während kein *BvNPCG1*, *BvGLP-r*, und *BvWDRP* Transkript in den feldgelagerten Zuckerrüben detektierbar ist (Daten nicht gezeigt), sind die jeweiligen *BvB12D* und *BvSP2* Transkriptlevel vergleichbar mit denen unter kontrollierten Lagerungsbedingungen. *BvB12D* ist in seiner Expression spät induziert, erst nach 42 Tagen Feldlagerung ist Transkript schwach detektierbar. *BvSP2* wird nach drei Tagen kontinuierlich bis zum Zeitpunkt der letzten Probennahme nach 49 Tagen bei vergleichbarer Stärke exprimiert. Für dieses Chitinase-Gen ist aufgrund seiner möglichen biotechnologischen Bedeutung zur Resistenzverbesserung auch das Expressionsprofil während der Zuckerrübenwachstumsphase aufgenommen worden, in Abbildung 20 sind diese Ergebnisse wiedergegeben. Hierbei zeigt sich, dass in der frühen Entwicklungsphase sowohl in der Primärwurzel (W) als auch in Blatt (B) und Petiole (P) schwach *BvSP2* Transkript detektierbar ist. Während in der entstehenden

Wurzelröbe die Transkriptmenge nach 17 Wochen auf einen nicht nachweisbaren Level sinkt, liegt in Blatt und Petiole eine starke Expression vor.



Abbildung 20: Agarosegelfoto einer semiquantitativen RT-PCR des spät induzierten Gens *BvSP2*. Als Template fungierte PolyA⁺ mRNA aus verschiedenen Geweben (W=Wurzel, B=Blatt, P=Petiole), isoliert zu unterschiedlichen Zeitpunkten (angegeben in Wochen [Wo]). Als Positivkontrolle (+) diente PolyA⁺ mRNA gelagerter Zuckerrüben, als Negativkontrolle (-) PolyA⁺ mRNA frisch geernteter Zuckerrüben. Als Ladekontrolle diente die Amplifikation des GAPDH-Gens dar.

3.2.2 Expressionsprofile des schwach früh induzierten Gens *BvRIP-r2*

Das Gen *BvRIP-r2*, welches ein Ribosomen inaktivierendes Protein codiert, wird sehr früh nach der Ernte der Zuckerrüben exprimiert. Wie aus Abbildung 21 (Lager) ersichtlich, ist bereits nach einem Tag Lagerung Transkript detektierbar, der Level fällt nach drei Tagen auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau ab. Gleiches gilt für die Analysen bei erhöhten Lagerungstemperaturen von 28 bzw. 26°C. Das anhand des feldgelagerten Materials erstellte Induktionsprofil verläuft gegensätzlich (Abbildung 21, Miete). Hier wird *BvRIP-r2* nach 28 und 42 Tagen nachweislich transkribiert.

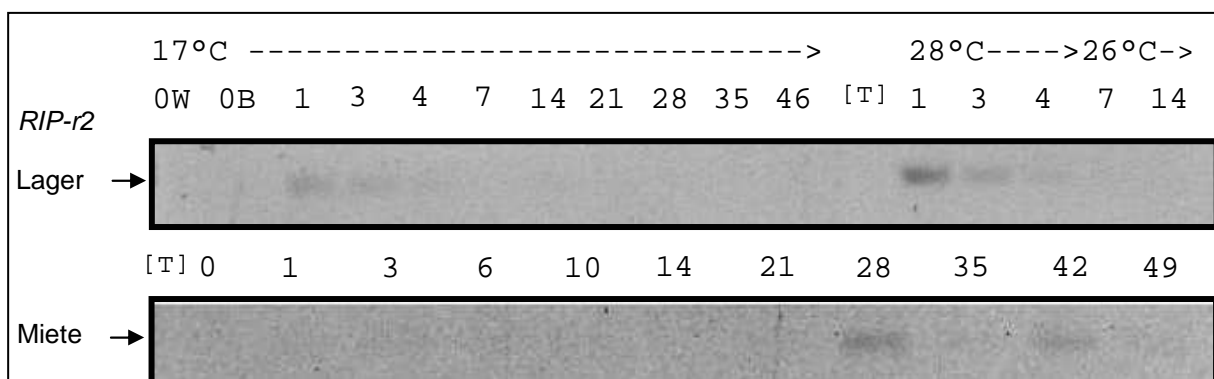


Abbildung 21: Agarosegelfoto einer semiquantitativen RT-PCR des schwach früh induzierten Gens *BvRIP-r2*. Als Template fungierte PolyA⁺ mRNA kontrolliert gelagerter (Lager) sowie feldgelagerter (Miete) Zuckerrüben.

3.2.3 Expressionsprofile der sechs zu allen Zeitpunkten schwach exprimierten Gene *BvPSK*, *BvC561R*, *BvBPM1*, *BvRCC*, *BvMARB* und *BvNPCG3*

Die in diesem Kapitel aufgeführten sechs Nach-Ernte induzierten Gene weisen als Gemeinsamkeit ein niedriges, konstantes Expressionsniveau während der Lagerung auf. In Abbildung 22 sind die Expressionsprofile im Lagerungsversuch unter kontrollierten Bedingungen aufgeführt. Alle Gene werden einen Tag nach der Lagerung in ihrer Expression induziert und zu jedem Zeitpunkt der Lagerung bei 17°C sowie bei 28/26°C ist Transkript detektierbar. *BvPSK* wird am schwächsten exprimiert und konnte erst durch eine Reamplifikations-PCR nachgewiesen werden, deren Ergebnis ebenfalls in Abbildung 22 wiedergegeben ist. Es ist auch Expression im Blatt unter den gewählten Reamplifikationsbedingungen detektierbar.

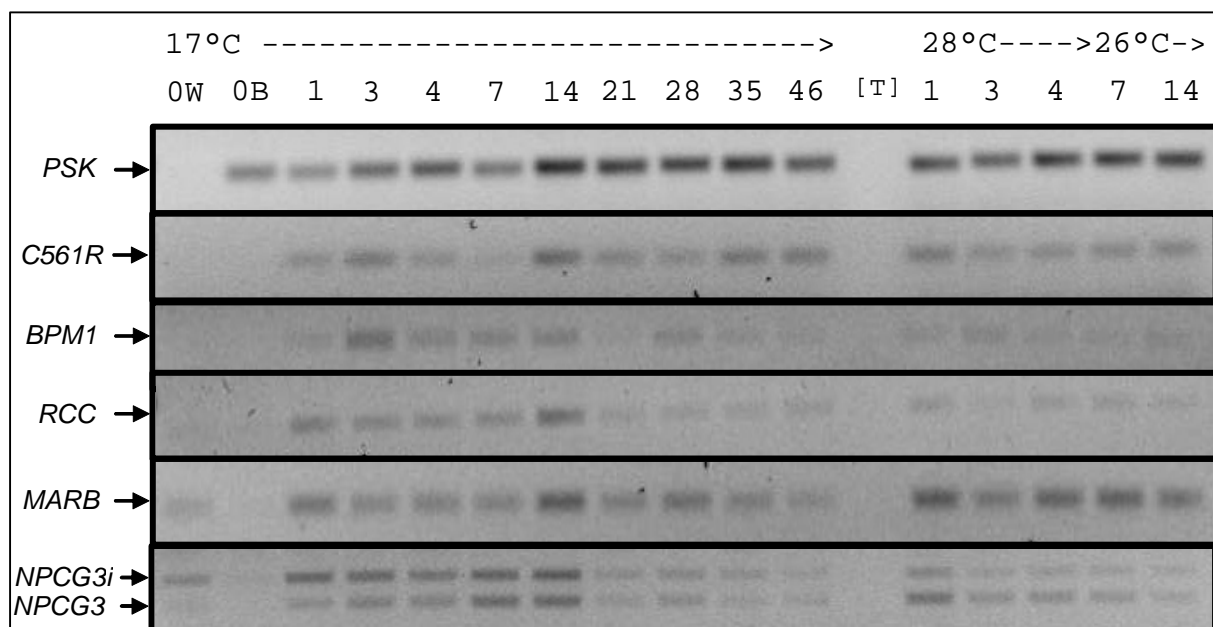


Abbildung 22: Agarosegelfoto einer semiquantitativen RT-PCR der sechs zu allen Zeitpunkten exprimierten Gene *BvPSK*, *BvC561R*, *BvBPM1*, *BvRCC*, *BvMARB* und *BvNPCG3*. Als Template fungierte PolyA+ mRNA kontrolliert gelagerter Zuckerrüben. Im Fall des Gens *BvNPCG3* steht das Kürzel *NPCG3i* für ein intronhaltiges Amplifikat nicht genomischen Ursprungs. Bei *BvPSK* ist das Ergebnis einer Reamplifikation gezeigt.

Bei dem für ein MAR-binding-Protein codierenden Gen *BvMARB* wurde auch in der cDNA-Population vor der Ernte Transkript detektiert. Gleiches gilt für das Transkript des nicht proteincodierenden Gens *BvNPCG3*. Hier liegt jedoch vermutlich eine regulatorische Besonderheit in Bezug auf das pre-mRNA Spleißen vor. Der im Zuge des cDNA-Screens isolierte Klon (Kapitel 3.1.1, Tabelle 16) stimmt mit dem zugehörigen SSH-Fragment zu 100% überein, beinhaltet jedoch zusätzlich ein Intron,

das dem SSH-Fragment fehlt (Daten nicht gezeigt). Während die gespleißte mRNA-Variante vor der Ernte kaum detektierbar ist, wird die intronhaltige Variante im RT-PCR Experiment nachgewiesen (Abbildung 22, vgl. Spur 0W NPCG3i mit NPCG3). Auffällig ist ferner, dass bei höheren Lagerungstemperaturen von 28/26°C der Transkriptlevel der gespleißten Variante gegenüber dem der ungespleißten etwas erhöht ist.

Die Expressionsdaten dieser kontinuierlich schwach exprimierten Gene in der Feldmiete sind weitestgehend kongruent zu den Daten des Lagerungsversuchs unter kontrollierten Bedingungen. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der RT-PCR mit PolyA+ mRNA aus feldgelagertem Material. *BvPSK* ist auch im Mietenmaterial nur mittels einer Reamplifikation nachweisbar. Zusammen mit *BvC561R*, dessen Translationsprodukt Homologien zu Cytochrom-b561 Oxidasen zeigt, weist das Expressionsprofil von *BvPSK* einen leichten Transkriptanstieg mit zunehmender Lagerungszeit auf.

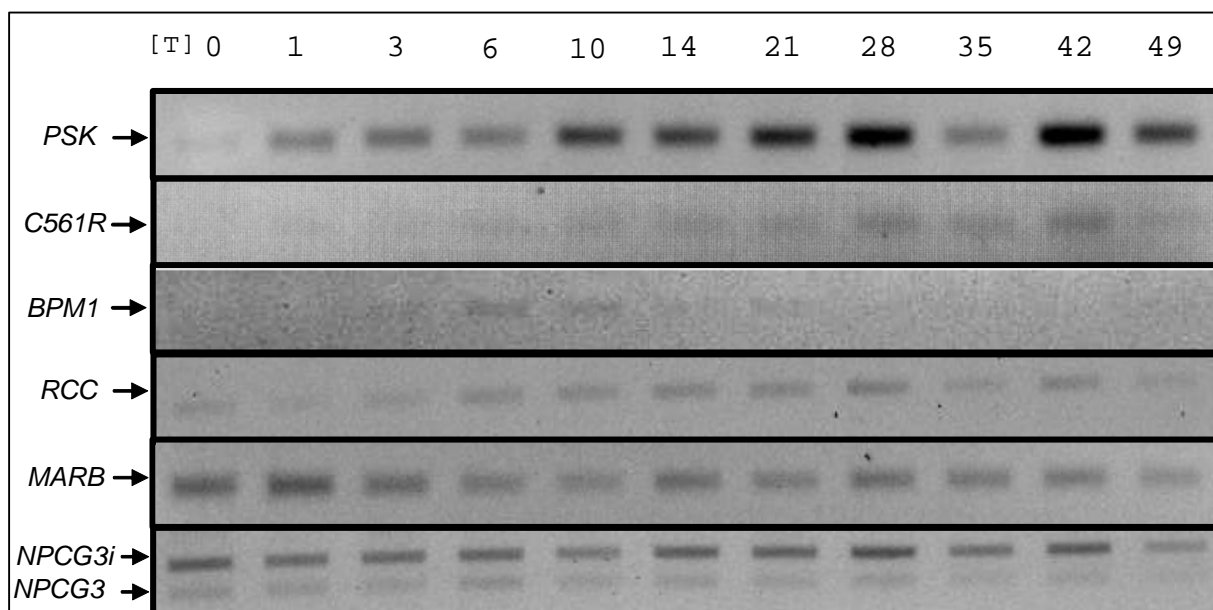


Abbildung 23: Agarosegelfoto einer semiquantitativen RT-PCR der sechs zu allen Zeitpunkten exprimierten Gene *BvPSK*, *BvC561R*, *BvBPM1*, *BvRCC*, *BvMARB* und *BvNPCG3*. Als Template fungierte PolyA+ mRNA feldgelagerter Zuckerrüben. Im Fall des Gens *BvNPCG3* steht das Kürzel *NPCG3i* für eine intronhaltiges Amplifikat nicht genomischen Ursprungs. Bei *BvPSK* ist das Ergebnis einer Reamplifikation gezeigt.

Im Fall von *BvNPCG3* tritt im Mietenmaterial die intronhaltige Variante (Abbildung 23, *NPCG3i*) verstärkt gegenüber der gespleißten Variante auf, was gegensätzlich zu den Ergebnissen bei höheren Lagerungstemperaturen von 28/26°C ist. Beim Gen

BvBPM1 ist lediglich im 6 und 10 Tage feldgelagerten Material Transkript nachweisbar.

Da die Regulation des Wasserhaushalts einer Nutzpflanze biotechnologisch von Interesse ist, zum Beispiel zur Erzeugung Trockenstress resistenter Sorten, wurde vom Aquaporin-Gen *BvBPM1* zusätzlich das Expressionsprofil während der Zuckerrübenentwicklung analysiert. Abbildung 24 ist zu entnehmen, dass zu keinem Zeitpunkt der Wachstumsphase Transkript im Blatt nachweisbar ist, während *BvBPM1* durchgehend in der Petiole exprimiert wird. In der Primärwurzel liegt der höchste Transkriptlevel nach einer Entwicklungszeit von vier und sechs Wochen vor. Der Level sinkt mit fortschreitendem Wachstum. Nach 25 Wochen ist in der Rübe kein Transkript mehr nachweisbar.

Für das PSK- α -Precursor-Gen *BvPSK* wurde das Expressionsprofil während der Zuckerrübenentwicklung ebenfalls untersucht (Abbildung 24). Hinsichtlich dieses Gens liegt eine potentielle biotechnologische Bedeutung in der Nutzung von Wachstumshormonen zur möglichen Ertragssteigerung begründet. Die *BvPSK* Transkription erfolgt vornehmlich im Blatt (B) und der Petiole (P). Es ist ein ansteigender Transkriptlevel im Zuge der Entwicklung zu detektieren. Gegenläufig verhalten sich die Transkriptgehalte in der Wurzel (W); während zu Beginn der Wachstumsphase Transkript schwach detektierbar ist, liegen nach 17 Wochen bereits keine nachweisbaren Mengen in der Rübe mehr vor.

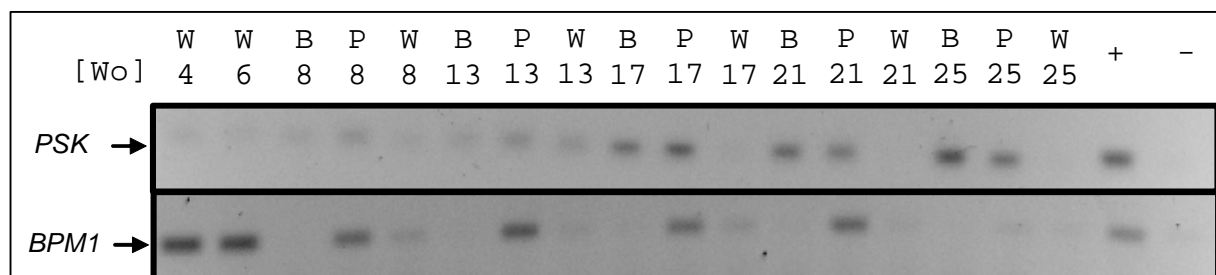


Abbildung 24: Agarosegelfoto einer semiquantitativen RT-PCR der zu allen Zeitpunkten exprimierten Gene *BvPSK* und *BvBPM1*. Als Template fungierte PolyA+ mRNA aus verschiedenen Geweben (W=Wurzel, B=Blatt, P=Petiole) isoliert zu unterschiedlichen Zeitpunkten (angegeben in Wochen [Wo]). Als Positivkontrolle (+) diente PolyA+ mRNA gelagerter Zuckerrüben, als Negativkontrolle (-) PolyA+ mRNA frisch geernteter Zuckerrüben. Bei *BvPSK* ist das Ergebnis einer Reamplifikation gezeigt.

3.2.4 Expressionsprofile der vier früh induzierten und durchgehend exprimierten Gene *BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2*

Die RT-PCR-Ergebnisse der letzten aufgeführten Klasse zeigen eine starke Expression der entsprechenden Nach-Ernte induzierten Gene. Die Stärke der Expression liegt über den in den vorangegangenen Kapiteln gezeigten. Abbildung 25 gibt die RT-PCR-Ergebnisse aus dem Lagerungsversuch unter kontrollierten Bedingungen wieder.

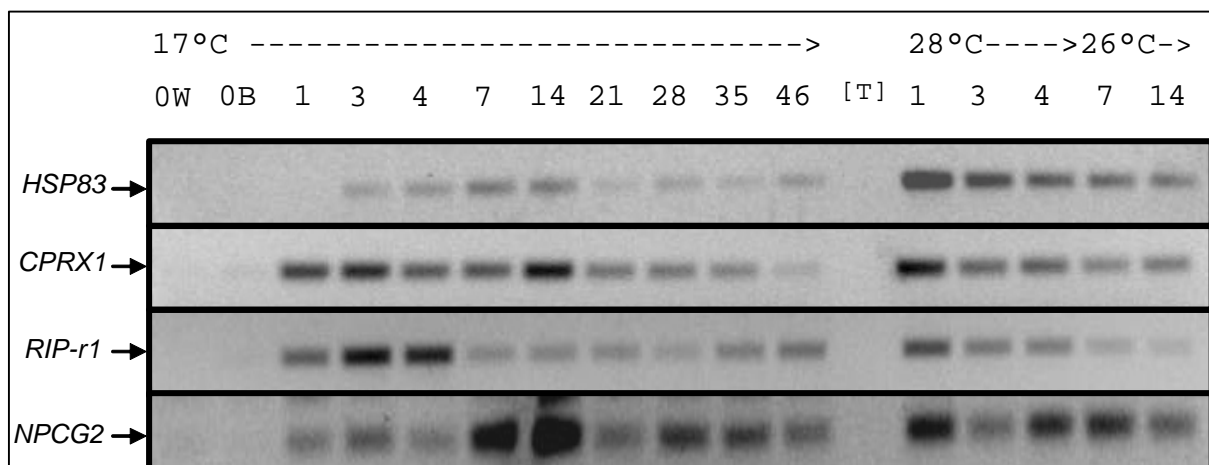


Abbildung 25: Agarosegelfoto einer semiquantitativen RT-PCR der vier früh induzierten und durchgehend exprimierten Gene *BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2*. Als Template fungierte PolyA+ mRNA kontrolliert gelagerter Zuckerrüben.

Die Gene *BvHSP83*, *BvCPRX1* und *BvRIP-r1* sind vor allem zu Beginn der Lagerung induziert. Die Transkriptlevel sinken mit zunehmender Lagerungszeit, bei *BvHSP83* und *BvCPRX1* nach 14 Tagen und bei *BvRIP-r1* nach 4 Tagen. Das nicht proteincodierende Gen *BvNPCG2* wird über den gesamten Lagerungszeitraum transkribiert. Bei der erhöhten Lagerungstemperatur zeigt *BvHSP83* die stärkste Induktion gefolgt von *BvCPRX1* und *BvNPCG2*.

Im Mietenmaterial unterscheiden sich die Induktionsprofile. In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der RT-PCR mit PolyA+ mRNA aus feldgelagerter Material visualisiert. Die Gene *BvCPRX1* und *BvNPCG2* werden kontinuierlich transkribiert mit einer Transkriptabnahme zum Ende der Lagerungsperiode. Demgegenüber wird die Transkription von *BvRIP-r1* und *BvHSP83* im Laufe der Feldlagerung hochreguliert.

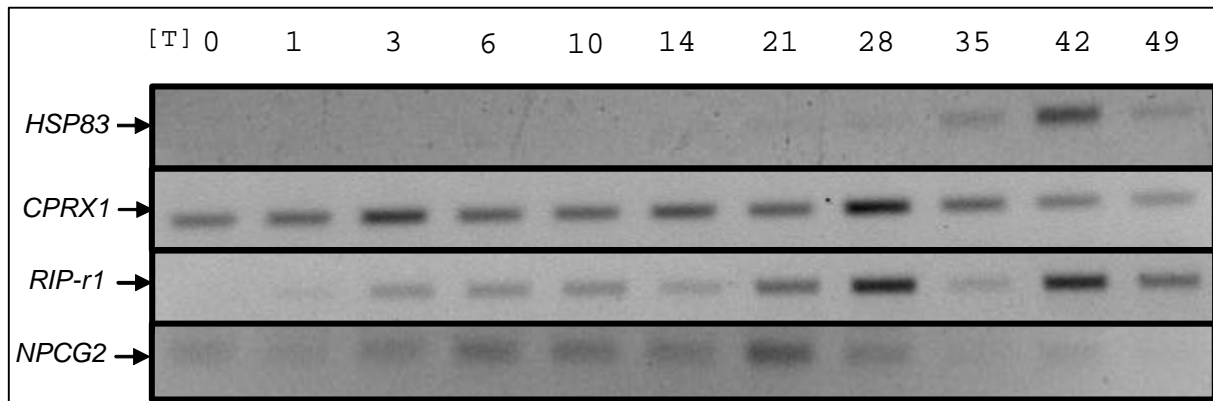


Abbildung 26: Agarosegelfoto einer semiquantitativen RT-PCR der vier früh induzierten und durchgehend exprimierten Gene *BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2*. Als Template fungierte PolyA+ mRNA feldgelagerter Zuckerrüben.

Die Analyse der Expressionsprofile wurde weiterhin auf die Zeit während der Zuckerrübenentwicklung ausgedehnt. Abbildung 27 gibt die erhaltenen RT-PCR-Ergebnisse wieder. Drei der vier Gene (*BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1*) weisen als Gemeinsamkeit eine insgesamt sehr schwache Expression vor der Ernte im Verhältnis zu den Nach-Ernte Zeitpunkten auf. Das vermutlich für kein Protein codierende Gen *BvNPCG2* wird auch in den sich entwickelnden Organen der Zuckerrübe zu allen Wachstumszeiten transkribiert, wobei eine im Gegensatz zu Petiole (P) und Wurzel (W) verhältnismäßig schwache Expression in den Blättern (B) vorliegt. *BvHSP83* Transkript ist weder in Blattstielen noch in Blattgewebe detektierbar.

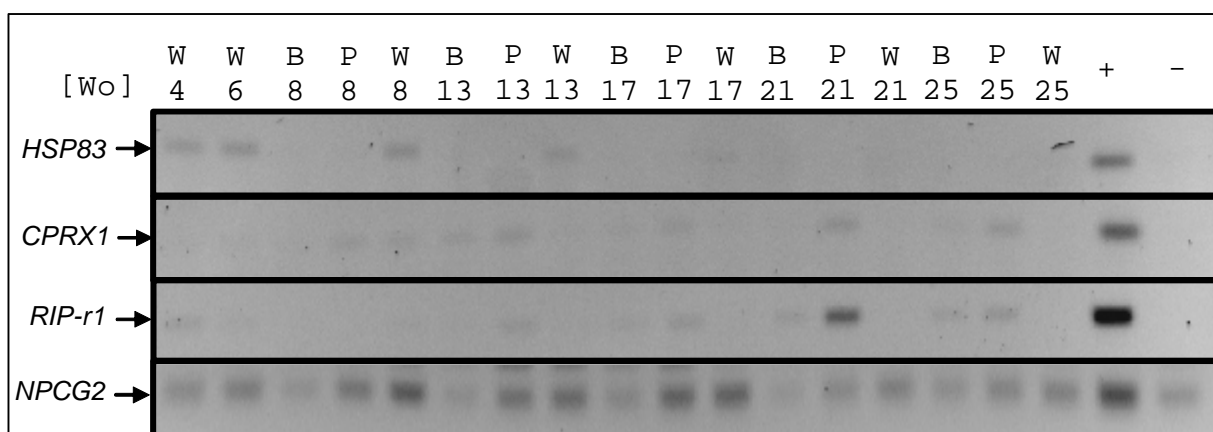


Abbildung 27: Agarosegelfoto einer semiquantitativen RT-PCR der vier früh induzierten und durchgehend exprimierten Gene *BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1*, *BvNPCG2*. Als Template fungierte PolyA+ mRNA aus verschiedenen Geweben (W=Wurzel, B=Blatt, P=Petiole), isoliert zu unterschiedlichen Zeitpunkten (angegeben in Wochen [Wo]). Als Positivkontrolle (+) diente PolyA+ mRNA gelagerter Zuckerrüben, als Negativkontrolle (-) PolyA+ mRNA frisch geernteter Zuckerrüben.

Von der 4. bis zur 17. Woche liegt eine schwache *BvHSP83* Expression in der Wurzel vor, im Anschluss bis zur Ernte wird kein Transkript mehr detektiert. Die Gene *BvCPRX1* und *BvRIP-r1* verhalten sich in ihrer Expression während der Entwicklungszeit ähnlich. Es sind nur geringe Transkriptgehalte in Blatt und Petiole vorhanden. In der Wurzel werden *BvCPRX1* und *BvRIP-r1* während des Zuckerrübenwachstums kaum transkribiert, erst nach der Ernte erfolgt die Transkriptionsinitiation.

3.2.5 Northern-Blot-Analyse der Gene *BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2*

Aufgrund der verhältnismäßig hohen Amplifizierbarkeit (Kapitel 3.2.4) von *BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2* während der Lagerung wird indirekt auf eine hohe Expressionsstärke geschlossen. Daher sind die Promotoren dieser Gene von besonderem Interesse für eine biotechnologische Nutzung. Zur Verifizierung der RT-PCR-Ergebnisse bezüglich Expressionsprofil und -stärke sind Northern-Blot Analysen (Kapitel 2.14.5) durchgeführt worden. Ferner konnte über die Analyse geklärt werden, ob die 5' Bereiche der isolierten cDNA-Klone (Kapitel 3.1.1) vollständig sind. In Abbildung 28 sind die Autoradiogramme der Gesamt-RNA-Blots, welche mit radioaktiv markierten SSH-Fragmenten der nachzuweisenden vier Gene hybridisiert wurden, dargestellt.

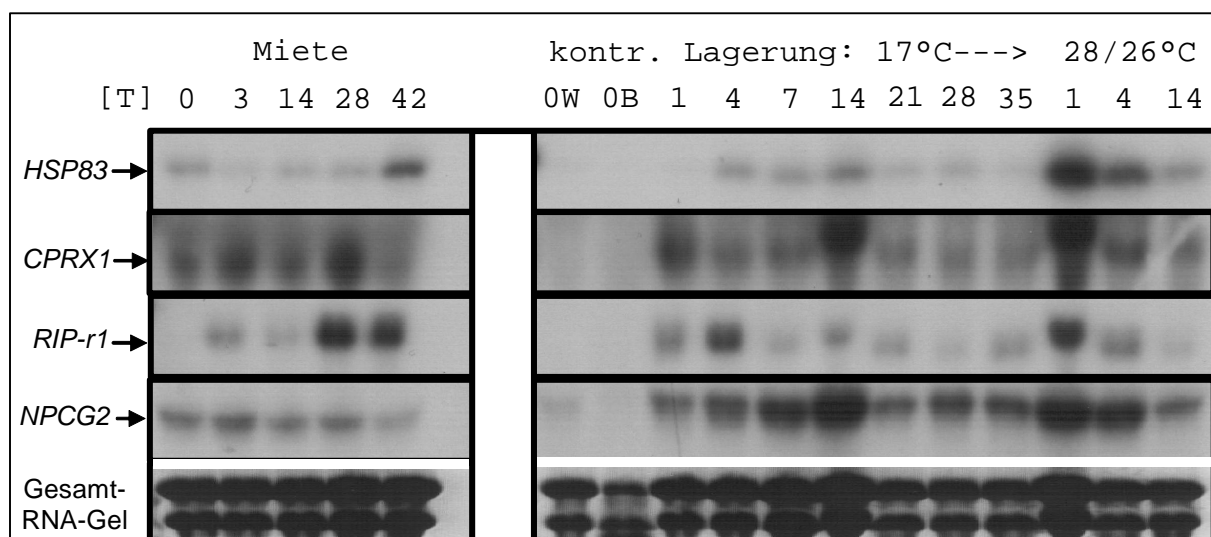


Abbildung 28: Northern-Blot Analyse der vier früh induzierten und durchgehend exprimierten Gene *BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2*. Gezeigt sind Autoradiogramme von Northern-Blots hybridisiert mit dem radioaktiv markierten SSH-Fragment des zugehörigen Gens. Als Material diente Gesamt-RNA aus feldgelagerten und kontrolliert gelagerten Zuckerrüben. Die Ladekontrolle stellt das Gelfoto der geblotteten Gesamt-RNA dar.

Als Ladekontrolle ist exemplarisch eines der geblotteten Gesamt-RNA-Gele gezeigt. Die sichtbaren Banden repräsentieren 18S- und 28S-rRNA. Das Gelfoto zeigt hinsichtlich der RNA-Menge eine relativ gleichmäßige Beladung, daraus resultiert eine hohe Vergleichbarkeit der Signalintensitäten untereinander. Lediglich in Spur 7, Spur 14 (17°C) und in Spur 1 (28°C) wurde eine höhere Menge Gesamt-RNA im Vergleich zu den anderen Proben aufgetragen, so dass dieser Umstand bei der Bewertung der Signalintensitäten berücksichtigt werden muss. Bezogen auf den kontrollierten Lagerungsversuch ist kaum Transkript vor der Ernte in der Wurzel (Spur 0W) zu detektieren, gleiches gilt für Zuckerrübenblätter (Spur 0B). Im Zuge der Lagerung ist bei allen vier Genen Transkript detektierbar, sowohl im kontrolliert (Lagerung) wie auch im feldgelagerten Material (Miete). Da für die Northern-Blots Gesamt-RNA verwendet wurde und eine relativ kurze Exposition der Röntgenfilme von 72h vorlag, kann auf eine hohe Expressionsstärke der vier Gene während der Lagerung geschlossen werden. Die Ergebnisse korrelieren gut mit den zugehörigen RT-PCR-Analysen (Abbildung 25 und 26). Während die Größen der hybridisierenden Transkripte von *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2* mit den isolierten cDNA-Größen (Kapitel 3.1.1) übereinstimmen, liegt im Fall von *BvHSP83* eine Diskrepanz vor. Das Signal im Northern-Blot liegt bei ca. 2300bp, während der isolierte cDNA-Klon nur 1286bp aufweist und somit am 5'-Ende um ca. 1000bp kürzer ist. Das 3'-Ende ist laut der durchgeführten Homologievergleiche vollständig (Kapitel 3.1.1, Tabelle 16).

3.3 Isolierung der Promotoren der Gene *BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2*

Die gezielte Expression eines Gens wird in der Regel über die regulatorische Sequenz 5' des Transkriptionsstarts, den Promotor, gesteuert. Unter der Annahme, dass Gene, die ähnliche Expressionsprofile aufweisen, auch Ähnlichkeiten in ihrer Promotorsequenz zeigen, sind die Promotoren der Gene *BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2* aus einer genomischen Lambda-Phagen-Bank der Zuckerrübe isoliert worden. Zu den Kriterien, die zur Auswahl dieser vier Gene führten, zählen Expressionsstärke und -kinetik. Die mittels semiquantitativer RT-PCR aufgenommene Expressionskinetik im Zuge der Lagerung zeigt eine visuell erkennbare Ähnlichkeit der Profile (Kapitel 3.2.4, Abbildung 25). Zudem wurde über Northern-Blots mit Gesamt-RNA gezeigt, dass die Gene als weitere Gemeinsamkeit eine relativ hohe Expressionsstärke aufweisen (Kapitel 3.2.4, Abbildung 28).

Da der exakte Transkriptionsstart nicht kartiert worden ist, erfolgte die Isolierung der Promotoren anhand des jeweils längsten cDNA-Klons (Kapitel 2.17). Das heißt, die 5'-UTR des cDNA-Klons musste eine hundertprozentige Sequenzübereinstimmung mit den isolierten genomischen Klonen aufweisen.

3.3.1 Die Promotoren der Gene *BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2* weisen eine TATA-Box auf

In Abbildung 29 sind die Länge der Promotoren sowie strukturelle Merkmale wie TATA-Box Position und das anhand der cDNA definierte Ende der 5'-UTR aufgeführt. Die Sequenzangaben sind bezogen auf das jeweilige Startcodon. Im Fall des Gens *BvNPCG2*, das kein längeres offenes Leseraster besitzt, dient das 5'-Ende des cDNA Klons als Referenzpunkt.

Die Position der TATA-Box ist mittels eines matrizenbasierten "patser matrices" Screens identifiziert worden (Kapitel 2.20.2). Die verwendete Matrize ist bei Shahmuradov *et al.* (2003) beschrieben. Für die Gene *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2* liegen vollständige cDNA-Klone vor, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Transkriptionsstart proximal zum 5'-Ende des cDNA-Klons liegt. Die TATA-Boxen liegen beim Gen *BvCPRX1* 60bp, bei *BvRIP-r1* 75bp und bei *BvNPCG2* 62bp vom 5'-Ende der jeweiligen cDNA entfernt. Im Fall von *BvHSP83* fehlen laut Northern-Blot Analyse dem größten cDNA-Klon am 5'-Ende ca. 1000bp zur Vollständigkeit.

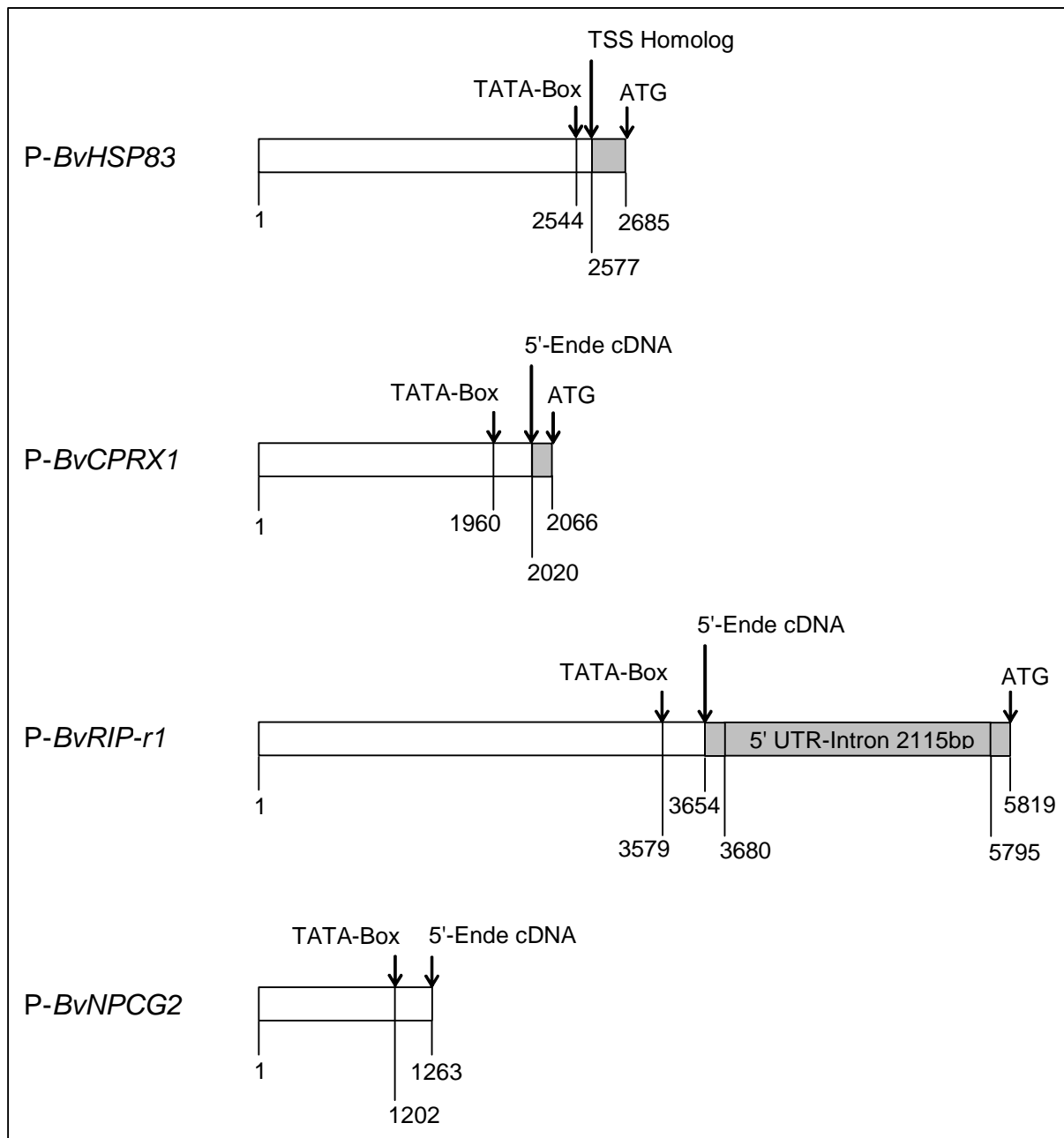


Abbildung 29: Struktur der Nach-Ernte induzierbaren Promotoren P-BvHSP83, P-BvCPRX1, P-BvRIP-r1 und P-BvNPCG2. Die 5'-UTR ist grau hinterlegt. Die Längenangaben erfolgen in [bp].

Anhand des hohen Konservierungsgrads zwischen *HSP*-Genen kann allerdings der Transkriptionsstartpunkt (TSS) durch Homologievergleiche für *BvHSP83* vorhergesagt werden. Er liegt im *A. thaliana* Homolog (At5g52640) 108bp upstream des Start-ATGs und somit 33bp vom TATA-Box-Start entfernt. Da die TATA-Box-Position in Bezug zum Start-ATG zwischen *BvHSP83* und dem *A. thaliana* Homolog konserviert ist (Daten nicht gezeigt), wird auch die TSS-Position als konserviert

angesehen. In Abbildung 29 ist daher der TSS für *BvHSP83* an Nukleotidposition nt2577 annotiert und liegt wie im Homolog 108bp vom Start-ATG entfernt.

Das Gen *BvRIP-r1* weist als Besonderheit ein 2115bp langes Leader-Intron in der 5'-UTR auf. Die Spleiß-Akzeptorstelle beginnt 24bp upstream des Startcodons.

3.4 Bioinformatische Analyse zur Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente

Die bioinformatische Analyse dient der Identifizierung gemeinsamer *cis*-regulatorischer Sequenzen. Die Ähnlichkeit der Expressionsprofile der vier durchgehend exprimierten Gene *BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2* ist ein Indiz für eine gemeinsame Regulation. Es sind zwei unabhängige Ansätze zur Identifizierung möglicher regulatorischer Motive verfolgt worden. Mittels des Tools "patser matrices" ist ein matrizenbasierter Screen nach bekannten Transkriptionsfaktorbindungsstellen durchgeführt worden (Kapitel 2.20.2). Das Tool "consensus" ermöglicht eine vergleichende Sequenz-Analyse mit dem Ziel, gemeinsame Motive zu identifizieren (Kapitel 2.20.1). Diese können dann eine neu identifizierte Bindungsstelle für bereits bekannte Faktoren darstellen. Eventuell stellen sie aber auch eine Bindungsstelle für einen bis dahin unbekannten Faktor dar. Die bioinformatische Analyse liefert eine Arbeitshypothese, die zur Verifizierung experimentell überprüft werden muss.

3.4.1 Eine matrizenbasierte Suche nach bekannten Transkriptionsfaktorbindungsstellen ergab keine Hinweise auf gemeinsame Nach-Ernte spezifische Elemente

Mittels des Tools "patser matrices" sind 1000bp regulatorische Sequenz upstream des Startcodons von 4 Nach-Ernte induzierten Genen und 14 nicht-Nach-Ernte induzierten Zuckerrübenreferenzgenen auf das Vorhandensein bekannter Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFB-sites) gescreent worden (Kapitel 2.20.2). Das Ziel der Analyse war der Nachweis potentiell Nach-Ernte spezifischer *cis*-Elemente in den vier Promotoren, die nicht in den Referenzpromotoren vorliegen. Eine Nach-Ernte spezifische Regulation wäre auch durch eine Gegenselektion von TFB-sites in den Promotoren denkbar, was sich durch die Abwesenheit bestimmter *cis*-regulatorischer Elemente äußern würde.

Das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle 18 dargestellt. Von 45 Matrizen weisen unter den gewählten Screening-Bedingungen (Kapitel 2.20.2) 28 Matrizen insgesamt 114 Matches in den analysierten Promotoren auf. Überlappende Sites von Faktoren derselben Familie wurden als 1 Match gewertet.

In allen Sequenzen werden TFB-sites detektiert. Es lässt sich jedoch kein Muster ableiten, welches bestimmte Transkriptionsfaktoren herausstellt, deren mögliche DNA-Bindung eine Nach-Ernte Induktion bewirkt. Außerdem konnte keine

Bindungsstelle für einen bekannten Transkriptionsfaktor identifiziert werden, welche in allen nicht-Nach-Ernte induzierbaren Promotoren auftritt, aber nicht in den vier Nach-Ernte induzierbaren Promotoren. Die Analyse liefert somit keine offensichtlichen Unterschiede hinsichtlich des Auftretens potentieller Transkriptionsfaktorbindungsstellen zwischen den Nach-Ernte induzierbaren Promotoren und den Referenzpromotoren.

Tabelle 18: Anzahl der Matches von 45 Matrizen, die potentielle TFB-sites repräsentieren, aus 15 Transkriptionsfaktor-Klassen in 4 Nach-Ernte induzierbaren Promotoren und 14 Zuckerrübenreferenzpromotoren.

TF-Klasse	Matrizen pro TF- Klasse	Spezifität der untersuchten Promotoren																	
		Nach-Ernte				Wurzel					Blatt			unterschiedliche Spezifität					
		<i>Bv</i> <i>HSP83</i>	<i>Bv</i> <i>CPRX1</i>	<i>Bv</i> <i>RIP-r1</i>	<i>Bv</i> <i>NPCG2</i>	<i>Bv</i> <i>Tlp2</i>	<i>Bv</i> <i>Smp</i>	<i>Bv</i> <i>His1-r</i>	<i>Bv</i> <i>Mll</i>	<i>Bv</i> <i>Tlp1</i>	<i>Bvcab</i> 11	<i>Bvcab</i> 12	Pro- tox	<i>BvPAL</i>	BV- 16/1	BV- 70/5	SAP	X12	Ch1
bZIP	7				1	1		2								1	1		
bHLH	2																		
DOF	4	1			2	2					1	4	1	2	1	1			
MADS	3		1	1					2	1									
AP2/EREBP	7	2	2			1	1		1			1	2		2				
MYB	9			1	4	1		2	1		2	1	1	4	2				9
Trihelix	1		1	2												2			
TCP	2	1				1				2		1		1	2	1			1
HD-Kn	1														1				
HD-PHD	1		1			1							1			1			6
HD-ZIP	4			2	1	1	1	1			2		1	1	2		2		
GATA	1					1		1				1			1	1			
WRKY	1																		
C2H2(Zn)	1																		
ARF1	1				1				1					1					

3.4.2 Eine vergleichende Sequenzanalyse der drei Promotoren *P-BvHSP83*, *P-BvRIP-r1* und *P-BvNPCG2* detektiert ein konserviertes 7bp-Motiv

Mittels des Tools "consensus" (Kapitel 2.20.1) wurde eine vergleichende Promotoranalyse zur Detektion konservierter Sequenzmotive in drei Nach-Ernte induzierbaren Promotoren durchgeführt.

Die "consensus-Analyse" der drei Promotoren *P-BvHSP83*, *P-BvRIP-r1* und *P-BvNPCG2* liefert mehrere Alignment-Matrizen, die konservierte Motive in den Promotorsequenzen beschreiben. Die einzige Alignment-Matrize, die in allen Positionen übereinstimmt, repräsentiert ein 7bp-Motiv, das in allen drei Promotoren vorliegt und jeweils die nachstehende Sequenz aufweist: 5'-GATGGTG-3'. Anhand der Alignment-Matrize, bestehend aus diesen drei identischen Sequenzen, wurde mittels des Programms "patser matrices" (Kapitel 2.20.2) eine Weight-Matrize (Hertz und Stormo, 1999) generiert unter Ausgabe der im Folgenden aufgeführten charakteristischen Score-Daten: Maximal-Score = 8,865; Minimal-Score = -9,704; Auto-Score = 4,215.

Um zu analysieren, ob weitere, dem 7bp-Motiv ähnliche, aber nicht vollständig konservierte Sequenzbereiche in den vier Nach-Ernte induzierbaren Promotoren *P-BvHSP83*, *P-BvCPRX1*, *P-BvRIP-r1* und *P-BvNPCG2* vorliegen, wurde eine matrizenbasierte Analyse mittels des Tools "patser matrices" (Kapitel 2.20.2) mit dieser Matrize durchgeführt. Die Analyse liefert 11 Matches, die einen höheren Score als den Auto-Score von 4,215 aufweisen (Tabelle 19).

Tabelle 19: Ergebnis des matrizenbasierten "patser matrices" Screen mit einem 7bp-Motiv in vier Nach-Ernte induzierbaren Promotoren. Es sind vier Matches grau hinterlegt, die in konserviertem Abstand zur TATA-Box lokalisiert sind.

Promotor	Orientierung	Abstand zur TATA-Box [bp]	7bp-Motiv	Score
<i>P-BvHSP83</i>	+	-371	GATGGTG	8.87
	-	+ 41	AATGGTG	5.97
	+	+137	GAAGGTG	6.54
<i>P-BvCPRX1</i>	-	-760	GATGATG	5.97
	-	-142	CATGGTG	5.97
<i>P-BvRIP-r1</i>	-	-180	GATGGTT	5.97
	-	-177	GATGATG	5.97
	+	+ 22	GATGGTG	8.87
<i>P-BvNPCG2</i>	+	-787	GATGGTG	8.87
	-	-500	AATGGTG	5.97
	-	-181	GATTGTG	5.97

Auffällig ist hierbei, dass bei den Promotoren *P-BvCPRX1*, *P-BvRIP-r1* und *P-BvNPCG2* mindestens ein Match in einem Abstand von 140-180bp zur jeweiligen TATA-Box vorliegt, diese Treffer sind in Tabelle 19 grau hinterlegt.

Aus allen 11 Matches wurde manuell die Matrize *Bv-L7* erstellt. Diese ist in Abbildung 30 inklusive der charakteristischen Score-Daten, welche mittels "patser matrices" (Kapitel 2.20.2) ermittelt wurden, gezeigt.

Matrize <i>Bv-L7</i> :							
	A		2	11	1	0	2 0 0
	C		1	0	0	0	0 0 0
	G		8	0	0	10	9 0 10
	T		0	0	10	1	0 11 1
Consensus :	G		A	T	G	G	T G
Max-Score :	9,095						
Min-Score :	-17,394						
Auto-Score:	5,050						

Abbildung 30: Matrize *Bv-L7* erstellt aus einer "patser matrices" Analyse mittels eines 7bp-Motivs von vier Nach-Ernte induzierbaren Promotoren.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Trefferquote der Matrize *Bv-L7* in den vier Nach-Ernte induzierbaren Promotoren *P-BvHSP83*, *P-CPRX1*, *P-BvRIP-r1* und *P-BvNPCG2* signifikant höher ist als in Zufallssequenzen, wurden mit dem Programm SeqToMatrix (Kapitel 2.20.1.1) vier unabhängige Datensätze von je 5 Zufallssequenzen à 1000bp Länge und den entsprechenden AT-Gehalten der Nach-Ernte induzierbaren Promotoren erzeugt. Die AT-Gehalte sind mithilfe des Programms CGcompareTWOSequences (Kapitel 2.20.1.1) ermittelt worden und ergeben sich geradzahlig gerundet zu 64% Promotor *P-BvHSP83*, 72% Promotor *P-BvCPRX1*, 68% Promotor *P-BvRIP-r1* und 62% Promotor *P-BvNPCG2*.

Ein "patser matrices" Screen mit der Matrize *Bv-L7* angewendet auf die erzeugten Zufallssequenzen liefert das in Tabelle 20 abgebildete Ergebnis. Die Analyse wurde mit einem Score von 5,97 durchgeführt. Dieser Wert gibt den Mindest-Score zur Detektion aller 11 sites, aus denen die Matrize *Bv-L7* erzeugt wurde, in den Nach-Ernte induzierbaren Promotoren wieder. Während die Matrize *Bv-L7* im Promotor *P-BvHSP83* drei Treffer aufweist (2. Spalte, Tabelle 20), liegen in den insgesamt fünf erzeugten Zufallssequenzen in drei Fällen gar keine Treffer und in zwei Fällen nur

ein Treffer vor. Das gleiche Ergebnis liefert die Zufallsanalyse für den Promotor P-*BvRIP-r1*. Im Fall des Promotors P-*BvNPCG2* liegen ebenfalls drei Treffer vor, hier weisen jeweils zwei der zugehörigen Zufallssequenzen einen bzw. zwei Treffer auf und eine Zufallssequenz weist keinen Treffer auf. Im Promotor P-*BvCPRX1* detektiert die Matrize *Bv-L7* zwei Treffer. Laut zugehöriger Zufallsanalyse liegen in drei Sequenzen keine und in jeweils einer Sequenz ein bzw. zwei Treffer vor.

Um zu prüfen, ob die erhaltenen Ergebnisse signifikant sind, wurde für jeden der vier Datensätze ein Student's t-Test (Kapitel 2.24.1, Formel 4) durchgeführt. Die zu verifizierende Alternativhypothese stellt die Annahme dar, dass die Anzahl der *Bv-L7* Matches im jeweiligen Nach-Ernte induzierbaren Promotor höher ist als die Anzahl der *Bv-L7* Matches in den generierten Zufallssequenzen. Bei einer Anzahl von fünf Zufallssequenzen liegt der kritische Wert K bei 2,132 für eine Aussagewahrscheinlichkeit von 95% (Zar, 1984). Da in allen Fällen $t > 2,132$ ist (Tabelle 20, äußere rechte Spalte), wird die Alternativhypothese bestätigt und aus statistischer Sicht matcht die Matrize *Bv-L7* signifikant häufiger in Nach-Ernte induzierbaren Promotoren als vom Zufall her erwartet.

Ein Vergleich der Consensus-Sequenz der Matrize *Bv-L7* mit der PLACE-(plant *cis*-acting regulatory element)-Datenbank, in der bekannte pflanzliche TFB-sites annotiert sind (Higo *et al.*, 1999), detektiert keine mit *Bv-L7* übereinstimmende TFB-site (Daten nicht gezeigt). Um zu analysieren, ob die Consensus-Sequenz der Matrize *Bv-L7* mit potentiellen Transkriptionsfaktoren oder anderen DNA-bindenden Proteinen interagiert, ist ein Hefe One-Hybrid Screen durchgeführt worden. Die Analyse detektierte keine Interaktion zwischen der konservierten DNA-Sequenz und Nach-Ernte exprimierten Proteinen der Zuckerrübe (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 20: Ergebnisse einer "patser matrices" Analyse zur Verifizierung der Aussage, dass die Matrize *Bv-L7* signifikant häufiger in Nach-Ernte induzierbaren Promotoren matcht als in Zufallssequenzen.

AT-Gehalt Nach-Ernte Promotor	Matches <i>Bv-L7</i> im Nach-Ernte Promotor	Matches <i>Bv-L7</i> in 5 Zufallssequenzen					t-Test t []
		Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	
64 % P- <i>BvHSP83</i>	3	0	1	0	0	1	10,61
72 % P- <i>BvCPRX1</i>	2	0	2	0	0	1	3,50
68 % P- <i>BvRIP-r1</i>	3	1	1	0	0	0	10,61
62 % P- <i>BvNPCG2</i>	3	1	1	2	2	0	4,80

3.4.3 Eine vergleichende Sequenzanalyse der 5' Bereiche von 16 Nach-Ernte induzierten Genen detektiert ein konserviertes 5bp-Motiv

Neben der bioinformatischen, programmgestützten Analyse der vier Promotoren *P-BvHSP83*, *P-BvCPRX1*, *P-BvRIP-r1* und *P-BvNPCG2* konnte visuell im Zuge der TATA-Box Annotation ein auffälliges Sequenzmotiv detektiert werden. Das Motiv ist in allen Fällen 3' der TATA-Box lokalisiert und weist jeweils die Sequenz 5'-TTCAT-3' auf. Bei *BvHSP83* liegt das Motiv 29bp downstream der TATA-Box, bei *BvCPRX1* 32bp, bei *BvNPCG2* 38bp und bei *BvRIP-r1* 77bp.

Da von 12 weiteren Nach-Ernte induzierten Genen Sequenzinformationen über die 5'-UTR vorlagen (Kapitel 2.20.3), wurden diese Sequenzen auf das Vorhandensein des 5bp-Motivs analysiert. In 5 der 12 Sequenzen wurde das Motiv detektiert. Davon ausgehend, dass der Transkriptionsstart eines Gens ungefähr 25bp downstream der TATA-Box liegt (Lewin, 1998), kann indirekt geschlossen werden, dass auch bei den Genen *BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2* das konservierte 5bp-Motiv in der 5'-UTR liegt. Damit weisen insgesamt 9 von 16 Nach-Ernte induzierten Genen das Motiv in der 5'-UTR auf. In Tabelle 21 ist das Motiv inklusive flankierender Basen (kleingedruckte Nukleotide) für die 9 Gene aufgeführt sowie dessen Orientierung und die relative Position zur TATA-Box oder zum 5'-Ende der cDNA. Aus diesen Sequenzen wurde manuell die Matrize *Bv-L9* erstellt (Abbildung 31), welche dazu beitragen kann, sequenzähnliche Motive in Referenzsequenzen zu detektieren. Die aufgeführten charakteristischen Score-Daten wurden mittels des Programms "patser matrices" (Kapitel 2.20.2) ermittelt.

Tabelle 21: Ergebnis der visuellen Analyse auf das Vorhandensein eines 5bp-Motivs in 5'-UTR Sequenzen Nach-Ernte induzierbarer Gene. In 9 von 16 Sequenzen liegt ein Match vor. Die Position des 5bp-Motivs ist entweder auf die TATA-Box bezogen oder, wenn diese nicht bekannt ist, auf das 5'-Ende der cDNA.

Gen	Orientierung	Position	5bp-Motiv
<i>BvNPCG1</i>	+	2bp downstream 5'-cDNA-Ende	aaTTCATaaa
<i>BvHSP83</i>	+	29bp downstream TATA-Box	ccTTCATcac
<i>BvCPRX1</i>	+	32bp downstream TATA-Box	atTTCATcaa
<i>BvRIP-r1</i>	+	77bp downstream TATA-Box	ccTTCATcca
<i>BvNPCG2</i>	+	38bp downstream TATA-Box	caTTCATtca
<i>BvRIP-r2</i>	+	21bp downstream 5'-cDNA-Ende	atTTCATccc
<i>BvWDRP</i>	+	26bp downstream 5'-cDNA-Ende	acTTCATcaa
<i>BvNPCG3</i>	+	240bp downstream 5'-cDNA-Ende	acTTCATcag
<i>BvTlp2</i>	+	1012bp downstream TATA-Box	aaTTCATcct

Matrize *Bv-L9*:

A | 6 3 0 0 0 9 0 1 5 5

C | 3 4 0 0 9 0 0 7 4 2

G | 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1

T | 0 2 9 9 0 0 9 1 0 1

Consensus : m h **T T C A T** c m a

Max-Score : 10,183

Min-Score : -21,621

Auto-Score: 5,190

Abbildung 31: Matrize *Bv-L9* generiert aus 9 Sequenzen vorliegend in 5'-UTRs Nach-Ernte induzierter Gene, die ein konserviertes 5bp-Motiv enthalten. Der Platzhalter m steht laut IUPAC-Code für die Nukleotide A oder C, h für die Nukleotide A oder C oder T.

Da die 5'-UTR sowohl in transkriptionelle als auch in translationelle Regulationsprozesse involviert sein kann, ergibt sich die Frage, ob ein Bezug zwischen dem identifizierten Motiv und der Nach-Ernte Induktion hergestellt werden kann. Ob das Auftreten des 5bp-Motivs in 5'-UTRs Nach-Ernte induzierter Gene signifikant erhöht ist, wird in den Kapiteln 3.4.4 und 3.4.5 analysiert.

3.4.4 Das konservierte 5bp-Motiv liegt signifikant häufiger in 5'-UTRs Nach-Ernte induzierter Gene vor als in Referenzsequenzen

Wie in Kapitel 3.4.3 gezeigt, liegt das 5bp-Motiv in 9 von 16 Nach-Ernte induzierten Genen vor, das entspricht einem Anteil von 56%. Um eine Aussage zu treffen, ob dieses Motiv im Vergleich zu nicht-Nach-Ernte induzierten Genen signifikant häufiger vorliegt, wurden im Zuge einer Kooperation mit der KWS Saat AG von Andreas Menze (pers. Mitteilung) 951 5'-UTR Referenzsequenzen (*Beta vulgaris*) auf das Vorhandensein des 5bp-Motivs analysiert. In 177 von 951 Sequenzen liegt das Motiv vor, was einem Anteil von 19% entspricht und damit nur einem Drittel im Vergleich zu den 5'-UTRs der Nach-Ernte induzierten Gene. Ein statistischer Vergleich der Mittelwerte der beiden Stichprobengruppen in Form eines Student's t-Tests bestätigt die Annahme des signifikanten Unterschieds. Bei 951 Referenzsequenzen liegt der kritische Wert K bei 1,962 für eine Aussagewahrscheinlichkeit von 95% (Zar, 1984). Der nach Formel 3 (Kapitel 2.24.1) berechnete Wert für |t| im konkreten Beispiel liegt bei 3,812 und damit oberhalb des kritischen Werts von 1,96. Damit wird

Alternativhypothese bestätigt und das 5bp-Motiv tritt signifikant häufiger in 5'-UTRs Nach-Ernte induzierter Gene auf als in den Referenzsequenzen.

Neben der Analyse auf das Vorhandensein des 5bp-Motivs in *Beta vulgaris* Referenzsequenzen wurden auch Sequenzen verschiedener Nicht-Beta Spezies untersucht. Bei dieser Analyse wurde anstatt des Screens nach dem 5bp-Motiv, eine "patser matrices" Analyse mit der Matrize Bv-L9 durchgeführt. Für das matrizenbasierte Screening wurden 305 Referenz-UTR-Sequenzen aus der PlantProm Datenbank (Shahmuradov *et al.*, 2003) verwendet. Die jeweils 50bp umfassenden 5'-UTR-Sequenzen wurden auf potentielle Matches der Matrize Bv-L9 bei einem Score von 6,65 analysiert. Dieser Wert gibt den Mindest-Score zur Detektion aller 9 sites, aus denen die Matrize Bv-L9 erzeugt wurde, in den 5'-UTRs der Nach-Ernte induzierten Gene wieder. In 13 von 305 5'-UTR Referenzsequenzen matcht die Matrize Bv-L9, was einem Anteil von lediglich 4% entspricht. Demgegenüber stehen 19% in den 5'-UTRs nicht-Nach-Ernte induzierter *Beta vulgaris* Gene und 56% in den 5'-UTRs Nach-Ernte induzierter *Beta vulgaris* Gene.

Ein Vergleich der Consensus-Sequenz der Matrize Bv-L9 mit der PLACE-(plant *cis*-acting regulatory element)-Datenbank, in der bekannte pflanzliche TFB-sites annotiert sind (Higo *et al.*, 1999), detektiert keine mit Bv-L9 übereinstimmende TFB-site (Daten nicht gezeigt). Um zu analysieren, ob die Consensus-Sequenz der Matrize Bv-L9 mit potentiellen Transkriptionsfaktoren oder anderen DNA-bindenden Proteinen interagiert, ist ein Hefe One-Hybrid Screen durchgeführt worden. Die Analyse detektierte keine Interaktion zwischen der konservierten DNA-Sequenz und Nach-Ernte exprimierten Proteinen der Zuckerrübe (Daten nicht gezeigt).

3.5 Funktionsanalyse Nach-Ernte induzierter Gene der Zuckerrübe im heterologen System *Arabidopsis thaliana*

Im Zuge der Analyse differentieller Genexpression bei gelagerten Zuckerrüben sind 16 Gene identifiziert worden, die verstärkt nach der Ernte exprimiert werden. Von diesen wurden drei aus biotechnologischer Sicht interessante Gene (*BvPSK*, *BvCPRX1*, *BvBPM1*) ausgewählt, um sie funktionell im heterologen System zu charakterisieren. Wie in Kapitel 2.19 beschrieben, sind die vollständigen cDNAs in einen T-DNA Vektor hinter den 35S-Promotor kloniert und die Konstrukte mittels der Floral-Dip-Methode in *A. thaliana* transformiert worden. *BvPSK* codiert für ein Peptid-Wachstumshormon, *BvCPRX1* für eine kationische Peroxidase und *BvBPM1* für ein integrales Plasmamembranprotein.

3.5.1 Wachstumsstimulierung durch Überexpression der *BvPSK*-cDNA in *Arabidopsis thaliana*

Mittels der Floral-Dip Methode sind vier unabhängige transgene *A. thaliana* Linien erzeugt worden, die eine aus Zuckerrüben stammende PSK- α -Precursor cDNA unter Kontrolle des 35S-Promotors exprimieren. Die Linien tragen die Bezeichnung PSK-2, PSK-3, PSK-5 und PSK-7. Mithilfe von Segregationsanalysen (Kapitel 2.23.3) inklusive statistischer Verifizierung (Kapitel 2.24.2, Anhang 7.3) wurde die Anzahl der unabhängig segregierenden T-DNA-Loci ermittelt. Während die Linie PSK-7 zwei T-DNA-Loci aufweist, liegt in den Linien PSK-2, PSK-3 und PSK-5 nur ein unabhängig segregierender T-DNA-Locus vor.

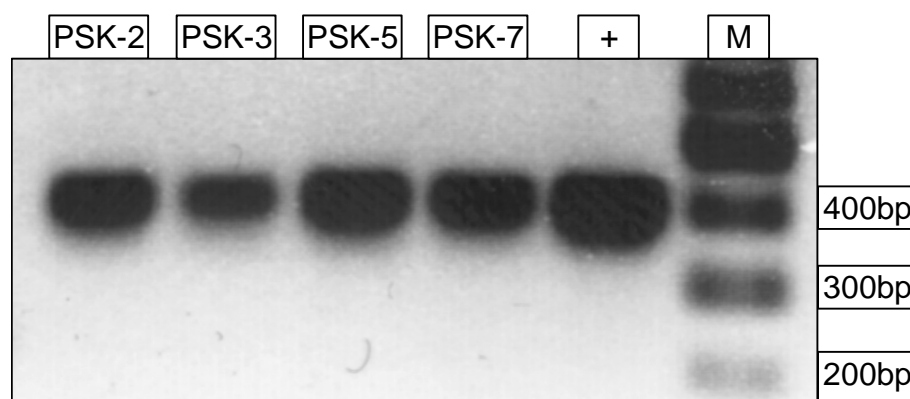


Abbildung 32: Agarosegelfoto der RT-PCR zur Prüfung auf Transgenexpression in den *BvPSK*-cDNA Überexpressionslinien. In Spur M ist der Marker aufgetragen und in Spur + das Ergebnis einer Kontroll-PCR mit *BvPSK*-Plasmid-DNA als Template.

Um die Frage zu beantworten, ob die *BvPSK*-cDNA in den transgenen Linien exprimiert wird, wurde das *BvPSK*-Transkript mittels RT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer (132.1-5' / SSH-132-Left, Kapitel 2.7) nachgewiesen. Das Ergebnis der RT-PCR ist in Abbildung 32 gezeigt. Bei allen Linien wurde die erwartete Amplifikatgröße von 404bp erhalten. In Linie PSK-2 und PSK-5 wurde zudem exemplarisch durch Sequenzierung die Authentizität des PCR-Produkts bestätigt.

Da *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen als Vergleichspopulation dienten, ist mit Selektionsmarker-freiem Medium gearbeitet worden. Um sicherzustellen, dass in den Folgegenerationen der durch Selbstung vermehrten transgenen Pflanzen die eingebrachte T-DNA nicht heraussegregiert, wurde auf homozygote Pflanzen zurückgegriffen.

Im ausgewachsenen Zustand wurden keine phänotypischen Unterschiede zwischen transgenen Linien und dem Wildtyp detektiert. Alle Pflanzen wiesen eine ähnliche Größe und Morphologie sowie kongruente Blütezeitpunkte auf.

In den ersten Tagen nach der Keimung lagen allerdings phänotypische Unterschiede hinsichtlich der Blattgrößen zwischen transgenen Linien und dem Wildtyp vor. Um diese beobachtete Blattflächenvergrößerung zu Beginn der Entwicklung genauer zu untersuchen, wurde eine vergleichende Analyse gleichzeitig ausgesäter Pflanzen durchgeführt. Es wurden insgesamt 100 Wt-Pflanzen, 129 Pflanzen der Linie PSK-2, 122 Pflanzen der Linie PSK-3, 110 Pflanzen der Linie PSK-5 und 108 Pflanzen der Linie PSK-7 analysiert (Kapitel 2.23.5). In Abbildung 33 ist exemplarisch jeweils eine MS-Platte von 11 Tage alten Pflanzen der transgenen Linien PSK-3, -5 und -7 sowie des Wildtyps gezeigt. Die Vergrößerung der Blattflächen bei den transgenen Linien ist hier optisch erkennbar. Mittels digitaler Vermessung der Blattflächen wurde der beobachtete Effekt der Blattflächenvergrößerung bei den transgenen Linien PSK-3, -5 und -7 verifiziert. Alle Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Messung 11 Tage alt (Vier- bis Sechsstadium, Abbildung 33).

In Tabelle 22 sind die ermittelten, durchschnittlichen Blattgrößen der einzelnen Linien aufgeführt. Während die Wildtyppflanzen eine durchschnittliche Blattgröße von 4440 ± 114 Pixel aufweisen, liegen die Blattgrößen der Linien PSK-3, PSK-5 und PSK-7 bis zu 40% darüber.

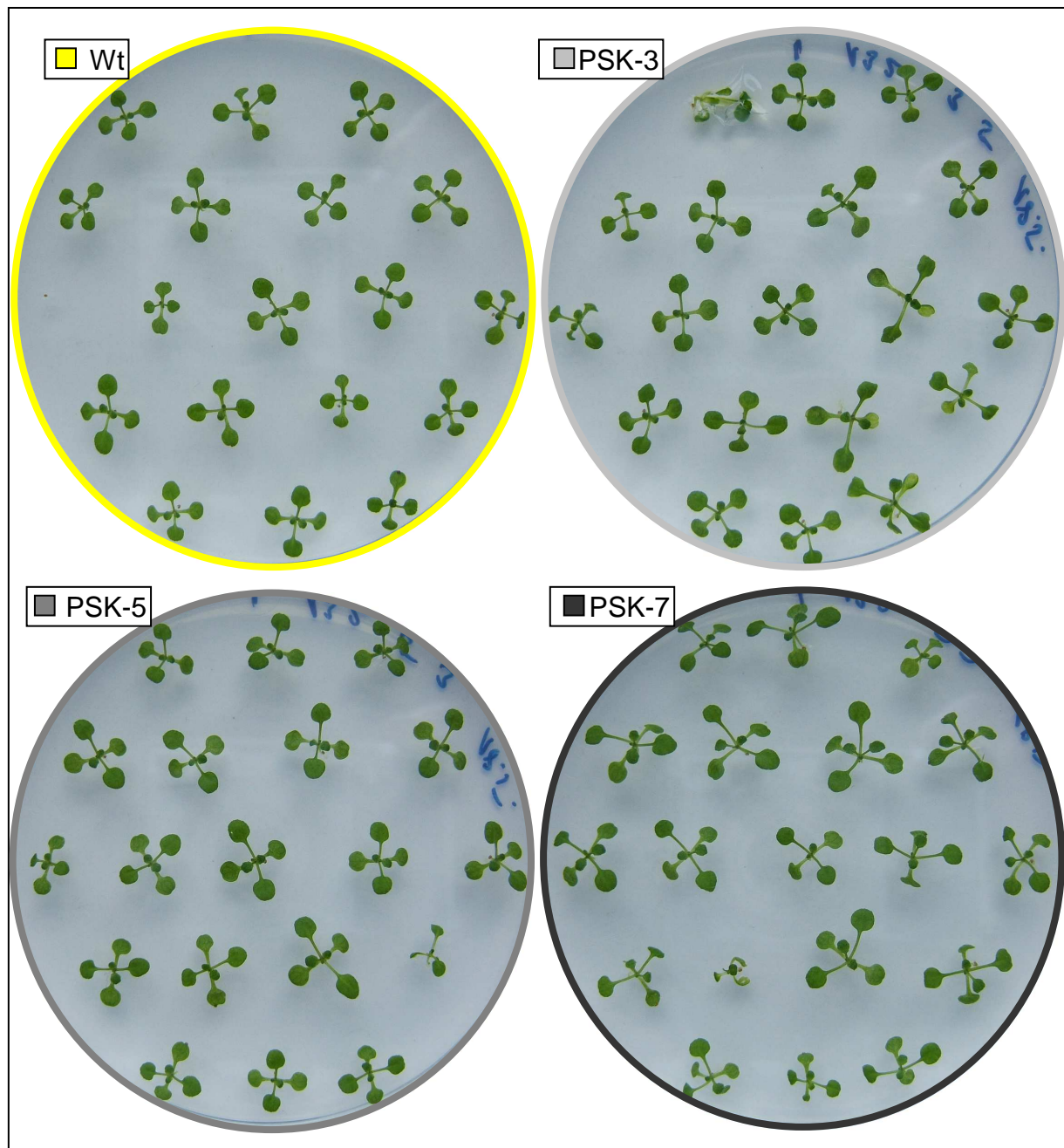


Abbildung 33: Digitalfotografie von 11 Tage alte Pflanzen der transgenen Linien PSK-3, -5 und -7 sowie des Wildtyps.

Tabelle 22: Mittelwerte der Blattgrößen von vier *A. thaliana* BvPSK-cDNA Überexpressionslinien

Linie	Mittelwert \pm mittlerer Fehler des Mittelwerts [Pixel]	Verhältnis zum Wildtyp [%]	Student's t-Test t []
Wildtyp	4440 \pm 114	100	-
PSK-2	3733 \pm 98	84	4,7
PSK-3	5712 \pm 108	129	8,0
PSK-5	5937 \pm 126	134	8,7
PSK-7	6226 \pm 197	140	7,7

Abbildung 34 zeigt die Summe der nach ihrer Blattgröße gruppierten Einzelpflanzen der vier transgenen Linien und des Wildtyps. Eine Gruppe umfasst dabei, bis auf die erste Gruppe (0-2000), einen Bereich von 750 Pixel. Der zugehörige Datensatz ist dem Anhang 7.4 zu entnehmen. In Abbildung 34 ist zu erkennen, dass bei den Linien PSK-3, -5 und -7 wesentlich mehr Pflanzen mit größeren Blattflächen nachzuweisen sind als beim Wildtyp. Die Verteilungs-Säulen dieser transgenen Linien sind im Vergleich zum in gelb dargestellten Wildtyp auf der Abszisse nach rechts zu höheren Werten verschoben. Lediglich die Linie PSK-2 liegt um 16% unter der durchschnittlichen Blattgröße des Wildtyps und die Verteilungs-Säulen sind somit leicht nach links versetzt (Tabelle 22 und Abbildung 34). Die Abweichungen der Blattgrößen im Vergleich zum Wildtyp sind bei allen vier Überexpressionslinien laut Student's t-Test statistisch signifikant.

Der jeweils berechnete Wert für t ist in Tabelle 22 aufgeführt. Alle t-Werte liegen oberhalb des kritischen Werts K von 2,626, welcher für eine Stichprobenanzahl von $n \geq 100$ und eine Aussagewahrscheinlichkeit von 99% gilt (Zar, 1984).

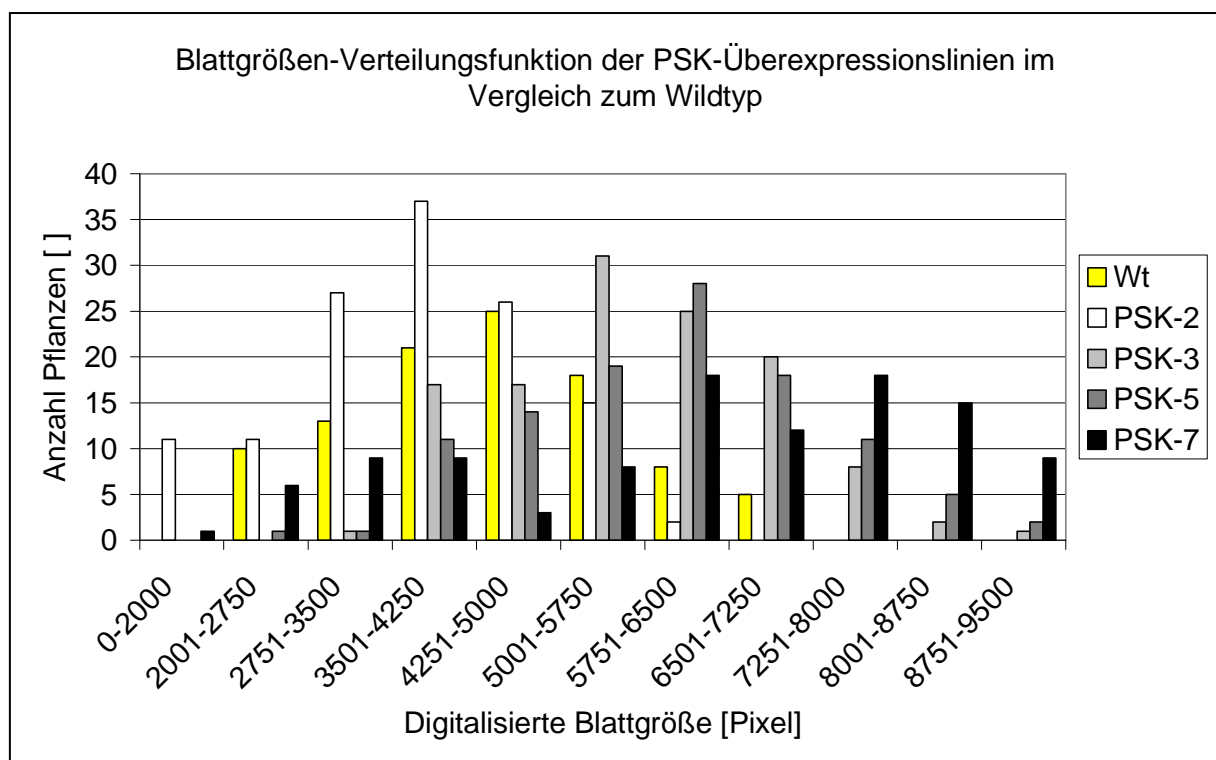


Abbildung 34: Ergebnis der Blattgrößenanalyse von vier *A. thaliana* PSK- α -Precursor cDNA Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp.

Zusammenfassend führt die Überexpression einer aus gelagerten Zuckerrüben isolierten PSK- α -Precursor cDNA in 3 von 4 homozygoten transgenen *A. thaliana*

Linien während der Entwicklung zu einer Vergrößerung der Blattfläche im Vergleich zum Wildtyp.

3.5.2 Die Überexpression der *BvCPRX1*- und *BvBPM1*-cDNAs in *Arabidopsis thaliana* führt zu keinen phänotypischen Veränderungen

Im Fall des Peroxidase Gens *BvCPRX1* sind mittels der Floral-Dip Methode 12 unabhängige transgene *A. thaliana* Linien erzeugt worden, welche die *BvCPRX1*-cDNA unter Kontrolle des 35S-Promotors exprimieren. Die Anzahl der jeweils unabhängig segregierenden T-DNA-Loci ist im Anhang 7.3 aufgeführt. Exemplarisch ist in Pflanzen der Linien CPRX1-1, CPRX1-2 und CPRX1-4 mittels RT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer das Peroxidase-Transkript nachgewiesen worden (Daten nicht gezeigt).

Die Gesamtperoxidaseaktivität wurde mittels eines photometrischen Guajacol-Assays mit löslichem Gesamtprotein-Isolat ermittelt (Riedle-Bauer, 2000). Im Fall der Linien CPRX-1, CPRX-2, CPRX-4 und des Wildtyps sind 6 Wochen alte Pflanzen eingesetzt worden. Bei den übrigen Linien und der Negativkontrolle, einer transgenen Linie mit dem insertlosen pVKH-T-DNA Vektor, wurden 10 Tage alte Keimlinge für eine Doppelbestimmung der Peroxidase-Aktivität verwendet (Anhang 7.5). Hierbei wurde festgestellt, dass die Peroxidase-Aktivität der transgenen Linien sich nicht signifikant von der Peroxidase-Aktivität der Kontrollen unterscheidet (Daten nicht gezeigt).

Im Fall des Aquaporin-Gens *BvBPM1* sind mittels der Floral-Dip Methode neun unabhängige transgene *A. thaliana* Linien erzeugt worden, welche die *BvBPM1*-cDNA unter Kontrolle des 35S-Promotors exprimieren. Die Anzahl der jeweils unabhängig segregierenden T-DNA-Loci ist im Anhang 7.3 aufgeführt. Zudem wurde durch RT-PCR Analyse exemplarisch in den Linien BPM1-1, BPM1-3 und BPM1-5 das Aquaporin-Transkript durch Verwendung spezifischer Primer nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Davon ausgehend, dass die Überexpression eines Aquaporin-Gens zu veränderten Reaktionen der Pflanze auf osmolaren Stress führen kann, sind jeweils 30-40 homozygote Pflanzen der Linien BPM1-3, BPM1-5 und des Wildtyps auf MS-Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 50, 100, 200 und 400mM) des Osmotikums Mannitol angezogen worden. Als Marker für eine phänotypische Veränderung wurde die Wachstumsgeschwindigkeit, repräsentiert durch die

Blattgröße, gewählt. Bei 4 Tage alten Keimlingen wurden die Blattgrößen über die Pixelanzahl einer zugehörigen Digitalfotografie quantifiziert (Anhang 7.6). Hierbei wurde festgestellt, dass mit steigenden Mannitol-Konzentrationen die Wachstumsgeschwindigkeit sukzessiv sinkt, allerdings liegen keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den transgenen BPM1-Linien vor (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

4.1 Differentielle Nach-Ernte induzierte Genexpression in Zuckerrüben

4.1.1 Die frühe Induktion und die Homologie der Gene *BvCPRX1*, *BvRCC*, *BvMARB* und *BvPSK* lassen auf Wundheilungsprozesse schließen

Die Ernte von Zuckerrüben führt zur Induktion verschiedener Stressantwortgene. Während viele Gene vor der Ernte in der Wurzelrübe gar nicht oder nur schwach transkribiert werden, erfolgt eine Induktion im verwundeten, stoffwechselangeregten Zustand nach der Ernte.

Im Fall der kationischen Peroxidase *BvCPRX1* liegt ein hoher Transkriptlevel zu Beginn des analysierten Lagerungszeitraums unter kontrollierten Bedingungen (Abbildung 25, Seite 68) wie auch in der Miete vor (Abbildung 26, Seite 69). Die Superfamilie der Klasse III Peroxidasen (Welinder, 1992), zu denen *BvCPRX1* zählt, wird allein in *A. thaliana* durch 73 Peroxidase-Gene repräsentiert (Tognolli *et al.*, 2002). Peroxidasen verwenden Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Co-Substrat bei der Oxidation verschiedener Moleküle (Lippard und Berg, 1995), sie sind in allen Stadien der pflanzlichen Entwicklung von Keimung bis Seneszenz aktiv (Passardi *et al.*, 2005). Die wahrscheinlichste Funktion von *BvCPRX1* stellt der Radikalstart der Lignin-Dehydrogenierungspolymerisation im Zuge der Zellantwort auf Verwundungen dar. Durch die Dehydrogenierung eines der drei Lignin-Monomere (p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol) wird die Polymerisation zu Lignin initiiert und offene Verwundungen, wie sie bei der Ernte durch Abschürfungen und den Köpfvorgang entstehen, geschlossen (Passardi *et al.*, 2005). Die frühe Induktion direkt nach der Verwundung und der abnehmende Transkriptlevel im Laufe der Lagerung (Abbildung 25, Seite 68) korrelieren gut mit der Annahme, dass *BvCPRX1* an der Ligninbiosynthese im Zuge des Wunderschlusses beteiligt ist. Das vorhandene peptidäre Sekretionssignal (Abbildung 7, Seite 53) lässt auf eine Funktion von *BvCPRX1* außerhalb der Plasmamembran im Apoplast schließen, wo auch die Ligninpolymerisation lokalisiert ist.

Während der Zuckerrübenentwicklung (Abbildung 27, Seite 69) ist kaum *BvCPRX1*-Transkript nachweisbar. Anhand dieser Tatsache ist die These formulierbar, dass die Lignifizierung im Zuge des Wundverschlusses spezifisch durch *BvCPRX1* initiiert wird und dass die Lignifizierungsvorgänge während der Entwicklung zum Beispiel im Xylem durch andere Peroxidasen reguliert werden. Lopez-Serrano *et al.* (2004) haben gezeigt, dass eine kationische Peroxidase aus *Zinnia elegans* spezifisch an

der Lignifizierung des Xylems beteiligt ist. Die Induktion der Genexpression verschiedener Peroxidasen durch physikalische Verwundung wurde bereits in Reis, Tabak, Tomate, Meerrettich und der Süßkartoffel gezeigt (Yoshida *et al.*, 2003).

Die aus der Literatur bekannten Überexpressionsstudien von Peroxidasen zeigen unterschiedliche Effekte bei den erzeugten transgenen Pflanzen, so dass eine Aussage über die jeweilige *in vivo* Funktion im homologen System nur schwer zu treffen ist. Lagrimini *et al.* (1990) wiesen eine 2-10 fach höhere Peroxidase-Aktivität in transgenen Tabakpflanzen nach, die eine homologe anionische Peroxidase unter 35S-Promotor Kontrolle überexprimieren. Phänotypisch zeigten die Pflanzen zum Blütezeitpunkt ein sehr schnelles Verwelken. Die heterologe Überexpression einer zellwandassoziierten Peroxidase aus Tomate in Tabak führte zu keinem sichtbaren Phänotyp unter normalen Wachstumsbedingungen (Amaya *et al.*, 1999). Die Keimungsrate der transgenen Linien unter Salz- bzw. Trockenstressbedingungen war jedoch erhöht. Eine erhöhte Toleranz gegenüber Sauerstoffstress wurde von Yun *et al.* (2000) durch die heterologe Überexpression einer anionischen Peroxidase aus der Süßkartoffel in transgenem Tabak gezeigt. Im Fall einer Meerrettich-Peroxidase führte die Überexpression in Tabak zu einer 2-10fach höheren Peroxidase-Aktivität im Blatt-Rohextrakt und zu einer 20%igen Wachstumssteigerung der transgenen Pflanzen (Kawaoka *et al.*, 1994).

Die Überexpression des Peroxidase-Gens *BvCPRX1* im heterologen System *A. thaliana* führte zu keiner Erhöhung der Gesamtperoxidaseaktivität (Kapitel 3.5.2, Seite 88) und während des Wachstums wiesen die transgenen Pflanzen keine visuell erkennbaren phänotypischen Veränderungen auf. Die Tatsache, dass in einem heterologen System gearbeitet wurde, könnte das Ausbleiben phänotypischer Veränderungen erklären. Obgleich die Genstruktur und einige essentielle Aminosäuren von Peroxidasen hoch konserviert sind, liegen vor allem beim pI-Wert große Unterschiede vor (Passardi *et al.*, 2005). Möglicherweise liegt in der pH-Regulation auch ein Schlüssel zur Funktionalität der Enzyme in der exprimierenden Pflanze. So könnten für die zuckerrübenspezifische kationische Peroxidase *BvCPRX1* weder im Modellsystem *A. thaliana* noch im gewählten Gesamtperoxidaseaktivitäts-Assay optimale Bedingungen vorgelegen haben und das Enzym war nicht aktiv.

Die schwache Induktion der Gene *BvRCC* (regulator of chromosome condensation) und *BvMARB* (Matrix-attached-region-binding) direkt nach der Ernte (Abbildung 22, Seite 65) ist ein Indiz für stattfindende Zellteilungen wahrscheinlich im Zuge der Wundheilung. Der Wundverschluss verletzten Pflanzengewebes erfolgt häufig in Form der Ausbildung eines Wundperiderms, verbunden mit mitotischer Aktivität der umliegenden Zellschichten (Strasburger, 1999). Das ableitbare Translationsprodukt des Gens *BvRCC* ist an der Ausbildung des Spindelapparates zur Chromosomensegregation während der Mitose beteiligt (Carazo-Salas *et al.*, 1999). MAR-binding-Proteine können in die Ausbildung von kondensierten Metaphase-Chromosomen involviert sein, wie sie im Zuge der Mitose vorliegen (Fujimoto *et al.*, 2004). Da das designierte MAR-binding-Protein *BvMARB* zudem eine NOP-Domäne aufweist, ist eine Funktion im Rahmen der Ribosomen-Synthese nicht auszuschließen (Gautier *et al.*, 1997). In Anbetracht des Verwundungsstress, welcher in den Geweben der gelagerten Zuckerrübe vorliegt, erscheint ein genereller Anstieg der Proteinbiosynthese vor allem zu Beginn der Lagerung logisch. Dadurch würde sich auch ein erhöhter Bedarf an Ribosomen erklären.

Die essentielle Bedeutung von Chromatinorganisation und Ribosomen-Synthese zeigen, warum *BvMARB* auch vor der Ernte schwach in der Zuckerrübe exprimiert wird (Abbildung 22, Seite 65). Die verstärkte Expression nach der Ernte in den ersten zwei Wochen der Lagerung ist somit ein Indiz für die erhöhte Stoffwechselaktivität nach der Ernte.

Ein weiteres Nach-Ernte induziertes Gen, dessen Translationsprodukt eine Rolle in stattfindenden Wundverschlussreaktionen spielen könnte, ist das PSK- α -Precursor-Gen *BvPSK*. Das sulfatierte Pentapeptid PSK- α ist ein sekretorisches, wachstumsstimulierendes Peptidhormon, das nach posttranslationaler Prozessierung aus einem Pre-Pro-Protein generiert wird (Yang *et al.*, 2000). Die Precursor weisen neben einem N-terminalen Sekretionssignal ein phylogenetisch hoch konserviertes Modul auf (Lorbiecke und Sauter, 2002). Das PSK- α -Precursor-Protein *BvPSK* weist sowohl dieses konservierte Modul als auch ein N-terminales Signalpeptid auf. Die mitogene Wirkung von PSK- α wurde erstmals an einer Suspensionskultur von Spargel-Mesophyll-Zellen (*Asparagus officinalis*) gezeigt (Matsubayashi und Sakagami, 1996). Ferner konnten Matsubayashi *et al.* (1996) beweisen, dass die Sulfatierung für die Funktionalität des Peptidhormons notwendig ist.

Genexpressionsstudien in Mais (*Zea mays* L.) zeigen, dass PSK- α -Precursor-Gene primär im Zuge der Gametophytenentwicklung aktiv sind (Lorbiecke *et al.*, 2005). Bei Reis (*Oryza sativa* L.) wurden Transkripte in Adventivwurzeln und Internodien nachgewiesen (Lorbiecke und Sauter, 2002). Neben der Wachstumsstimulation vermittelt extern appliziertes PSK- α in Kombination mit Auxin- und Cytokinin-Gabe die Differenzierung von Mesophyll-Zellen der Zinnie (*Zinnia elegans*) zu Xylem-Leitbahn-Zellen (Matsubayashi *et al.*, 1999). Ferner wird die somatische Embryogenese von Kallus-Kulturen der Karotte (*Daucus carota* L.) durch PSK- α induziert (Hanai *et al.*, 2000).

Bei mechanisch verwundeten Kartoffelknollen haben Fabbri *et al.* (2000) eine erhöhte mitotische Aktivität umliegender Gewebe nachgewiesen, begleitet von erhöhten Auxin-Konzentrationen (Indol-3-Essigsäure, IAA). Wie IAA führt auch PSK- α zu einer erhöhten mitotischen Aktivität und lässt sich somit in die Regulationsmechanismen im Zuge des Wundverschlusses einbinden.

Das *BvPSK*-Transkript liegt nur in geringen Konzentrationen in der Wurzelrübe während der Lagerung vor (Abbildung 22, Seite 65). Im Vergleich zu den anderen Nach-Ernte induzierten Genen musste bei den RT-PCR-Analysen auf Reamplifikationen zurückgegriffen werden. Die Tatsache, dass im Zuge der Zuckerrübenentwicklung vornehmlich Transkript in Blättern und Petiolen nachgewiesen wurde (Abbildung 24, Seite 67), spricht für eine aktive Rolle von *BvPSK* bei der Entwicklung der oberirdischen Organe. In Anbetracht der Tatsache, dass in anderen pflanzlichen Organismen PSK- α -Precursor durch Genfamilien codiert werden (Lorbiecke und Sauter, 2002), kann dies auch bei der Zuckerrübe der Fall sein. Bei einem hohen Konservierungsgrad auf Nukleotidebene könnten in den RT-PCR Analysen mehrere Isoformen erfasst worden sein, die allerdings einer unterschiedlichen Regulation unterliegen. Die Isoform des im Blatt nachgewiesenen Transkripts muss nicht zwangsläufig mit der Isoform aus der Wurzel übereinstimmen. Die Tatsache, dass nach der Ernte verstärkt Transkript in der Wurzelrübe detektierbar ist, unterstreicht die mögliche Beteiligung an Wundverschlussreaktionen. Der nach Abschluss der Wundheilung noch vorliegende *BvPSK*-Transkriptlevel in der Wurzelrübe (Abbildung 22, Seite 65) kann durch eine mögliche Sprossung der gelagerten Rüben erklärt werden. Jaggard *et al.* (1997) berichten von Sprossbildung und entstehenden jungen Blättern bei mietengelagerten Zuckerrüben (60 Tage) im Zusammenhang mit sinkenden Amino-N-Konzentrationen. Auch wenn eine

Sprossung bei den kontrolliert gelagerten Rüben dieser Arbeit (46 Tage) nicht beobachtet wurde, kann nachweisbares *BvPSK*-Transkript zum Ende der Lagerung auf eine beginnende Sprossung hindeuten.

Das identifizierte PSK- α -Precursor-Gen *BvPSK* führt bei einer 35S-Promotor vermittelten Überexpression in *A. thaliana* zu durchschnittlich 35% größeren Blattflächen bei den transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 34, Seite 87). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Überexpressionsstudien von Yang *et al.* (2001). Hier führte die jeweilige Überexpression der endogenen *A. thaliana* PSK- α -Precursor-Gene *AtPSK2* und *AtPSK3* zu transgenen Kalli, die um das Zweifache größer waren als transgene Kalli, die kein PSK- α -Precursor-Gen überexprimierten. Die erhaltenen Ergebnisse der *BvPSK*-Überexpression müssen kritisch betrachtet werden, da weder ein PSK- α -Precursor noch das sulfatierte Pentapeptid durch proteinchemische Methoden nachgewiesen wurden. Diesbezüglich ist allerdings anzumerken, dass der Nachweis des Pentapeptids PSK- α bisher nur in Suspensionszellkulturen gelungen ist, aber nicht in intakten Pflanzen (Yang *et al.*, 2001). Entgegen des beobachteten Effekts der Blattflächenvergrößerung bei *BvPSK*-Überexpression teilt Matsubayashi (2003) mit, dass eine PSK- α -Precursor-Gen Überexpression im Allgemeinen keinen Effekt auf das Pflanzenwachstum hat. Um abschließend klären zu können, ob das Peptidhormon PSK- α , dessen Entstehung durch die *BvPSK* cDNA-Überexpression postuliert wird, als Faktor für die beobachtete Blattflächenvergrößerung bei transgenen *A. thaliana* Pflanzen mitverantwortlich sein kann, muss das sulfatierte Pentapeptid proteinchemisch in den Pflanzen nachgewiesen werden.

4.1.2 Die Nach-Ernte induzierte Genexpression der Gene *BvCPRX1* und *BvC561R* lässt auf vorliegenden Sauerstoffstress schließen

Die Ergebnisse von Amaya *et al.* (1999) aufgreifend, können Peroxidasen auch in den Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im peroxidativen Zyklus involviert sein (Passardi *et al.*, 2005). Dieser Zusammenhang kann die Induktion der kationischen Peroxidase *BvCPRX1* nach der Ernte der Zuckerrüben ebenfalls erklären. Nach dem Entfernen des Rübenkörpers aus der Erde wird selbiger höheren Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt und somit die Wahrscheinlichkeit der Bildung von schädlichen ROS erhöht. Zum Beispiel verdirbt die Maniokknolle nach der Ernte

innerhalb von 72h aufgrund eines verwundungsinduzierten oxidativen Ausbruchs (Reilly *et al.*, 2004). Verantwortlich für den schnellen Verderb sind unter anderem irreparable Schädigungen der Zellen durch ROS. Im Fall geernteter Zuckerrüben liegt eine solche Schädigung zwar nicht vor, aber die durchgehende Expression von *BvCPRX1* könnte auf einen Schutzmechanismus vor ROS zurückzuführen sein. Unterstrichen wird diese These durch die Expression des Cytochrom-b561-Gens *BvC561R* während der Lagerung (Abbildung 22, Seite 65). Cytochrom-b561-Oxidasen sind plasmamembranständige Enzyme, die an der Redoxkontrolle des Antioxidationsmittels Ascorbat beteiligt sind (Asard *et al.*, 2001). Diese Membranständigkeit konnte beim *BvC561R*-Translationsprodukt *in silico* nachgewiesen werden (Abbildung 14, Seite 57). Ascorbat selbst fungiert als Sauerstoffradikalfänger und schützt somit die Zelle vor ROS, es wird zu Monodehydroascorbat (MDHA) oxidiert. Die Regeneration der oxidierten Form zurück zu Ascorbat wird durch Cytochrom-b561-Oxidasen katalysiert (Verelst und Asard, 2003). Die durchgehende *BvC561R*-Expression während der Lagerung deutet auf vorliegenden Sauerstoffstress hin und somit den erhöhten Regenerationsbedarf von MDHA zu Ascorbat.

4.1.3 Involvierung von sieben Nach-Ernte induzierten Genen in die Pathogenabwehr

Im verwundeten Zustand nach der Ernte sind Zuckerrüben vor allem von der Infektion mit Pilzsporen bedroht (Wyse, 1980). Der nicht entfernte Erdbehang stellt ein stetes Inokulum bodenbürtiger Pilze wie *Penicillium claviforme*, *Fusarium culmorum*, *Botrytis cinerea* sowie *Phoma betae*, einem dem Saatgut anhaftenden Pilz, dar.

Bereits einen Tag nach der Ernte ist ein Transkriptanstieg der Gene *BvRIP-r1* (Abbildung 25, Seite 68) und *BvRIP-r2* (Abbildung 21, Seite 64) zu verzeichnen, welche beide Ribosomen-inaktivierende Proteine codieren. Die exakte physiologische Funktion von RIPs ist noch immer unklar. Sicher ist die Zuordnung zu den 'pathogenesis related' (PR) Proteinen (Girbes *et al.*, 1996). RIPs sind in drei Klassen einteilbar (Nielsen und Boston, 2001), wobei sowohl *BvRIP-r1* als auch *BvRIP-r2* zur Klasse I zählen. Der Name 'Ribosomen-inaktivierende Proteine' leitet sich aus der Fähigkeit aller drei Klassen ab, die N-glycosidische Bindung eines konservierten Adenins (A4324) in der Sarcin/Ricin-Schleife der 26S bzw. 28S rRNA

zu spalten (Endo und Tsurugi, 1987). Die Spaltung führt zur Depurinierung an dieser Position. Dadurch verliert die rRNA die Fähigkeit, eine charakteristische Konformation auszubilden und der Elongationsfaktor EF-2 (EF-G) vermag nicht mehr an das Ribosom zu binden, so dass die Translation zum Stillstand kommt. Aus dieser Wirkungsweise leiten sich zwei Abwehrmechanismen ab, die beide auf der RNA-N-Glycosidase Aktivität von RIPs beruhen. Zum einen durch direkte Wechselwirkung mit dem Pathogen, bei der RIPs der Klasse I endocytotisch durch die Pathogen-Zelle aufgenommen werden (van Damme *et al.*, 2001) und zum anderen durch die Inaktivierung der zelleigenen Ribosomen und somit dem Einleiten des induzierten Zelltods (Narayanan *et al.*, 2005). RIPs der Klasse I tragen Signalpeptide, die sie nach der Synthese räumlich von den endogenen Ribosomen trennen, um eine Inaktivierung selbiger zu verhindern (Nielsen und Boston, 2001). Die hier diskutierten BvRIP-r1 und BvRIP-r2 tragen Sekretionssignale (Abbildung 8 und 9, Seite 54). Im Fall des BvRIP-r2 ist dieses Signal spaltbar und das Peptid wird in den sekretorischen Pathway eingeschleust, während das BvRIP-r1-Signalpeptid nicht spaltbar ist und das Protein vermutlich an der ER- oder Plasmamembran verbleibt. Eine extrazelluläre Aufnahme von BvRIP-r1 durch ein penetrierendes Pathogen ist somit unwahrscheinlich.

Neben der RNA-N-Glycosidase-Aktivität sind bei RIPs noch weitere enzymatische Funktionen nachgewiesen worden, zu denen unter anderem DNase- und RNase-Aktivitäten zählen (Park *et al.*, 2004). Aus diesen Fähigkeiten leiten sich vermutlich auch die antiviralen Eigenschaften der Klasse I RIPs ab. Tumer *et al.* (1997) haben nachgewiesen, dass eine Deletionsvariante des 'Pokeweed antiviral proteins' (PAP) zwar nicht mehr in der Lage war, Ribosomen zu depurinieren, wohl aber eine Resistenz in transgenem Tabak gegenüber dem 'potato virus X' (PVX) zu erzeugen. Demnach müssen die antiviralen Eigenschaften nicht zwangsläufig mit der RNA-N-Glycosidase-Aktivität gekoppelt sein.

Die Induktion von RIP-Genen kann durch verschiedene Signale ausgelöst werden. Girbes *et al.* (1996) haben gezeigt, dass zwei RIPs der Zuckerrübe, die primär im Blatt exprimiert werden, nach viraler Infektion induziert werden. Die Induktion konnte künstlich durch die Behandlung mit Salicylsäure und Wasserstoffperoxid, zwei Signalmolekülen der systemisch erworbenen Resistenz (Systemic Acquired Resistance, SAR), reproduziert werden. Neben dieser Art der Induktion kann auch die mechanische Verwundung zu einer systemischen Induktion von RIPs führen. Bei

Song *et al.* (2000) ist die Induktion eines RIP-Gens in *Phytolacca insularis* (Kermesbeerengewächs) durch Verwundung oder Behandlung mit den Phytohormonen Jasmon- und Abscisinsäure beschrieben. In diesem Fall führt eine Behandlung mit Salicylsäure zu keiner verstärkten Expression. RIPs zählen zu den PR-Proteinen und stehen somit am Ende der Signaltransduktionskaskade von Verwundung (Leon *et al.*, 2001) oder Pathogenpenetration (Durrant und Dong, 2004). Über den auslösenden Faktor, der zur Induktion der Gene *BvRIP-r1* und *BvRIP-r2* nach der Ernte der Zuckerrübe führt, kann nur spekuliert werden. Die Expressionsprofile unter kontrollierten Bedingungen sprechen für eine systemische Induktion im Zuge der Zellantwort auf die vorliegende Verwundung, da der Transkriptlevel zu Beginn der Lagerung höher ist als zu späteren Zeitpunkten nach erfolgter Wundverschlussreaktion. Das *BvRIP-r1* Gen zeigt allerdings nach 46 Tagen erneut einen leichten Transkriptanstieg (Abbildung 25, Seite 68). Die Ergebnisse der Expressionsanalyse des feldgelagerten Mietenmaterials lassen möglicherweise den Schluss zu, dass eine beginnende Pathogen-Infektion zu den erhöhten Transkriptleveln zum Ende der Lagerungszeit führt (Abbildung 26, Seite 69). Gleichwohl auf welche Faktoren die Induktion auch zurückzuführen ist, selbige zeigt das Bestreben der während der Lagerung stoffwechselaktiven Rübe, einer Infektion mit Pathogenen systemisch vorzubeugen oder eine Infektion aktiv zu bekämpfen. Die Tatsache, dass *BvRIP-r1* während der Zuckerrübenentwicklung kaum transkribiert wird (Abbildung 27, Seite 69), deutet auf einen Wachstumsprozess ohne Verwundungen und ohne inkompatible Pathogeninteraktionen hin.

Die exakten Funktionen von *BvRIP-r1* und *BvRIP-r2* sind anhand der vorliegenden Daten in Form der Genexpressionsprofile und der *in silico* Proteinanalyse nicht zu klären. Da nach der Ernte vornehmlich pilzliche Infektionen von Bedeutung sind, wie zum Beispiel die Mietenfäule (Keller, 1999), wäre eine Induktion aufgrund der antifungalen Wirkung oder des induzierten Zelltods im Zuge einer postinfektionellen hypersensitiven Reaktion möglich.

Die Expressionsprofile von zwei weiteren PR-Protein Genen sprechen für einen möglichen Pathogenbefall zum Ende des betrachteten Lagerungszeitraums von 7 Wochen. Das Chitinase-Gen *BvSP2* zeigt die höchste Expression nach 46 Tagen Lagerung unter kontrollierten Bedingungen (Abbildung 18, Seite 62). Das Gen *BvGLP-r*, codierend für ein Germin-like Protein mit möglicher Oxalat-Oxidase

Aktivität, zeigt direkt nach der Ernte gar keine Expression und erst nach 46 Tagen Lagerung ist eine Induktion erkennbar (Abbildung 18, Seite 62). Diese Ergebnisse korrelieren mit der Annahme, dass über einen längeren Zeitraum gelagerte Zuckerrüben durch einen Pathogenbefall bedroht sind.

Saure Chitinasen zählen zur Enzymklasse der O-Glycosyl-Hydrolasen und besitzen somit die katalytische Fähigkeit, Glucosamin-Bindungen in Chitin-Polymeren spezifisch zu spalten (Brameld und Goddard, 1998). Da viele Pilzzellwände chitinhaltig sind (Adams, 2004), resultiert aus der beschriebenen katalytischen Fähigkeit die antifungale Wirkung von Chitinasen. Die saure Chitinase BvSP2 wurde bereits von Nielsen *et al.* (1994) charakterisiert. Nach einer Infektion von Zuckerrübenblättern mit dem pilzlichen Erreger *Cercospora beticola* wurde ein signifikanter Transkriptanstieg beobachtet, aus dem ein Anstieg der BvSP2-Proteinkonzentration resultierte. Im Einklang mit diesen Ergebnissen kann die starke Induktion von BvSP2 zum Ende des beobachteten Lagerungszeitraums (Abbildung 18, Seite 62) auf eine Pathogeninfektion trotz kontrollierter Lagerung zurückgeführt werden. BvSP2 wird auch im Laufe der Zuckerrübenentwicklung im Blattgewebe (Abbildung 20, Seite 64) induziert, was durch eine Infektion mit einem Blattfleckenkrankheitserreger (*Cercospora beticola*, *Erysiphe betae*) erklärt werden kann.

In den Versuchen von Nielsen *et al.* (1994) wurde die fortschreitende Symptomentwicklung der *C. beticola* Infektion durch die BvSP2-Chitinase jedoch nicht beeinflusst. *In vitro* Assays zeigten auch keine antifungale Wirkung von BvSP2 auf *C. beticola* Sporen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das BvSP2-Gen systemisch nach Applikation eines biotischen Stresses, wie der Infektion mit einem Pathogen, induziert wird. Saure PR-Proteine, zu denen BvSP2 zählt, werden in Ihrer Expression primär durch Salicylsäure, Vermittler der SAR, induziert (Kasprzewska, 2003).

Das BvGLP-r Translationsprodukt weist ebenfalls einen sauren isoelektrischen Punkt auf und zeigt Homologien zu Oxalat-Oxidase ähnlichen Germinen. Die exakte Funktion von Proteinen der GLP-Familie ist nicht eindeutig geklärt (Bernier und Berna, 2001). Ihnen werden verschiedene Eigenschaften zugeschrieben, wie eine Oxalat-Oxidase-Aktivität, Superoxid-Dismutase-Aktivität, extrazelluläre Rezeptorfunktion oder die Funktion als katalytisch inaktives Strukturprotein. Die im gegebenen Zusammenhang wahrscheinlichste Funktion ist der Oxalat-Abbau. Phytopathogene

Pilze wie *Sclerotinia sclerotiorum* sekretieren Oxalsäure, um die pflanzliche Zellwand durch Komplexbildung von Calcium-Ionen zu destabilisieren (Lane, 1994) oder eine Abwehr der Pflanze in Form des oxidativen Ausbruchs zu verhindern (Cessna *et al.*, 2000). Das durch den Oxalat-Abbau generierte Wasserstoffperoxid fungiert als Toxin gegen das infizierende Pathogen. Eine Induktion von Oxalat-Oxidasen nach einer Pilzinfektion wurde bei Weizen und Gerste beobachtet (Hurkman und Tanaka, 1996; Dumas *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995). Donaldson *et al.* (2001) haben gezeigt, dass die Überexpression eines aus Weizen isolierten Germis mit Oxalat-Oxidase-Aktivität in Soja zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum* führt. Gleichmaßen führt die Überexpression endogener Weizen GLPs zu einer Resistenzsteigerung transgenen Weizens gegenüber Mehltau (Schweizer *et al.*, 1999). Das abzubauen Oxalat muss allerdings nicht vom Pathogen stammen, auch endogenes Oxalat kann zu H_2O_2 oxidiert werden und als Mediator oder als direkt wirksames Toxin in der hypersensitiven Reaktion fungieren (Bernier und Berna, 2001).

Der Oxalsäure-Abbau erfolgt im Apoplast, wo die meisten GLPs lokalisiert sind (Bernier und Berna, 2001). Das BvGLP-r Protein weist ein N-terminales Signalpeptid auf (Abbildung 10, Seite 55), durch welches es in den sekretorischen Pathway eingeschleust wird und somit auch potentiell im Apoplast lokalisiert ist. Die sehr späte Induktion von *BvGLP-r* während der Lagerung (Abbildung 18, Seite 62), die postulierte apoplastische Lokalisierung des Proteins zusammen mit dem sauren pI-Wert sprechen dafür, dass es sich um ein PR-Protein handelt, das nach einer Pathogenpenetration zum Ende der Lagerung im Zuge der SAR aktiviert wird. Ein weiteres Indiz, welches für diese Infektionshypothese spricht, ist die Induktion des Seneszenz assoziierten Gens *BvB12D* nach 46 Tagen Lagerung (Abbildung 18, Seite 62). Im gegebenen Zusammenhang wurde ein *B12D*-cDNA-Homolog aus Reis (AF012897) durch Behandlung mit pilzlichem Elicitor induziert (Huang *et al.*, 2001).

Die bereits diskutierte kationische Peroxidase BvCPRX1 zählt ebenfalls zu den PR-Proteinen. Peroxidasen werden in der Literatur durch die indirekte Pathogenabwehr in Form der Lignifizierung von Zellwänden beschrieben (van Loon und van Strien, 1999). Neben dem Abbau der reaktiven Sauerstoffspezies Wasserstoffperoxid im peroxidativen Zyklus, generieren Peroxidasen aber auch ROS im so genannten hydroxylytischen Zyklus (Passardi *et al.*, 2005), welche dann im oxidativen Ausbruch

toxisch auf die penetrierenden Pathogene wirken und zur Nekrotisierung des befallenen Gewebes führen (Lamb und Dixon, 1997; Bolwell *et al.* 1995). Die frühe Induktion des Peroxidase-Gens *BvCPRX1* spricht für eine Funktion im Zusammenhang mit den Wundverschlussreaktionen. Basische PR-Proteine, zu denen *BvCPRX1* wie auch *BvRIP-r1* und *-r2* zählen, werden durch das Verwundungshormon Jasmonsäure induziert (Liechti und Farmer, 2002; Kasprzewska, 2003). Daher ist eine Rolle von *BvCPRX1* in der Pathogenabwehr durch Produktion von ROS nicht auszuschließen.

Abschließend wird die *BvHSP83*-Induktion im Zusammenhang der Pathogenabwehr diskutiert. Heat-Shock Proteine der Familie 90, in die *BvHSP83* fällt, zählen nicht zu den PR-Proteinen. Sie fungieren als molekulare Chaperone und können somit posttranslational regulatorisch wirken. Diese postulierte regulatorische Wirkung wird in jüngster Zeit mit der Pathogenabwehr in Verbindung gebracht (Sangster und Queitsch, 2005). So konnten Lu *et al.* (2003) bei *Nicotiana benthamiana* zeigen, dass im Zuge der Resistenz-Protein (R-Protein) vermittelten Pathogenabwehr HSP90-Proteine eine entscheidende Rolle spielen. Durch die Beteiligung an der R-Protein vermittelten Infektionserkennung stehen HSP90-Proteine am Anfang der Signalkaskade (Belkhadir *et al.*, 2004; Schulze-Lefert, 2004). Ob die *BvHSP83*-Induktion in gelagerten Zuckerrüben aufgrund ablaufender Prozesse in der Infektionsabwehr erfolgt, kann nicht eindeutig geklärt werden. Während der Zuckerrübenentwicklung liegt kaum Transkript vor (Abbildung 27, Seite 69), so dass die Induktion nach der Ernte (Abbildung 25, Seite 68) vermutlich auf einen Stresszustand zurückzuführen ist, der während einer normalen Entwicklung nicht vorliegt. Die Induktion aufgrund der gewählten Lagertemperatur von 17°C unter kontrollierten Bedingungen ist unwahrscheinlich, da vergleichbare Temperaturen auch während des Wachstums vorliegen. Bei der Lagerung zeigt sich die temperaturabhängige Induktion von *BvHSP83* bei einer Temperatur von 28°C/26°C (Abbildung 25, Seite 68). Die Induktion im feldgelagerten Material zum Ende der Ernte (Abbildung 26, Seite 69) kann durch das Vorliegen eines pathogeninfizierten Bereichs innerhalb der Miete erklärt werden. Solche so genannten Hot-Spots weisen aufgrund fermentativer Prozesse eine erhöhte Temperatur auf. Gleichwohl kann die Induktion wie zuvor beschrieben im Zuge der R-Protein vermittelten Pathogenabwehr erfolgt sein.

4.1.4 Die Nach-Ernte induzierte Genexpression des Aquaporin-Gens *BvBPM1* weist auf Veränderungen im Wasserhaushalt gelagerter Zuckerrüben hin

Durch die Verwundung bei der Ernte und die anschließende Lagerung sinkt der Wassergehalt in der Zuckerrübe; es können Verluste von 50-600g pro Tag und Tonne auftreten in Abhängigkeit von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit (van der Poel, 1998). Die natürliche Wasseraufnahme über die Seitenwurzeln aus dem Boden kann nach der Ernte nicht mehr erfolgen. Für das Aufrechterhalten metabolischer Prozesse ist somit der Verbrauch des gespeicherten Wassers unumgänglich, wenngleich das Speicherorgan der Zuckerrübe gegenüber geernteten Blättern oder Früchten einjähriger Pflanzen nach der Ernte deutlich weniger Wasser verliert (Galindo *et al.*, 2004).

Die schwache Induktion (Abbildung 22, Seite 65) des Gens *BvBPM1*, dessen Translationsprodukt zu den Wassermolekül transportierenden integralen Plasmamembranproteinen zählt (Barone *et al.*, 1997), kann mit dem erlittenen Wasserverlust nach der Ernte in Verbindung gebracht werden. Aus warmer Luft, die mit gelagerten kalten Zuckerrüben in Kontakt kommt, kann Wasserdampf an der Oberfläche kondensieren (van der Poel, 1998). Dieser Effekt ist besonders stark bei hohen Temperaturunterschieden zwischen Luft und Oberfläche, welche häufig direkt nach der Ernte vorliegen, bevor der Rübenkörper die Umgebungstemperatur angenommen hat. Die höhere Expression von *BvBPM1* nach der Ernte ist daher hypothetisch auf den Versuch der Pflanzenzellen zurückführbar, durch verstärkte Synthese von Aquaporinen kondensiertes Wasser in das Cytosol zu transferieren. Die Fähigkeit von Aquaporinen, den Wassergehalt im Cytosol zu erhöhen, ist unter anderem an *Xenopus laevis* Oocyten durch die Expression von Mais-Aquaporinen gezeigt worden (Chaumont *et al.*, 2000). Oocyten, die das Aquaporin in ihre Plasmamembran integrierten, schollen und platzten in hypotonischer Lösung wesentlich früher als Kontroll-oocyten.

A. thaliana weist 13 Aquaporin-Mitglieder der PIP-Familie auf, deren Genexpressionsverhalten sich stressabhängig verändert (Jang *et al.*, 2004). Im Trockenstresszustand werden in Blatt und Wurzel nach 24h neun Gene stark in Ihrer Expression herunterreguliert und vier schwach hochreguliert. *BvBPM1* zeigt die höchste Homologie zum *A. thaliana* Aquaporin-Gen *PIP2.1* (At3g53420.1), welches auch in der Arbeit von Jang *et al.* (2004) zu den in der Wurzel bei Trockenstress schwach hochregulierten Genen zählt.

4.1.5 Die Nach-Ernte induzierte Expression des Gens *BvB12D* deutet auf beginnende Seneszenz-Prozesse in gelagerten Zuckerrüben hin

Die Veränderung des Genexpressionsprofils während der Alterung pflanzlicher Gewebe ist am ausführlichsten bei der natürlichen Blattseneszenz charakterisiert (Yoshida, 2003). Im Zuge der ablaufenden Prozesse, die über den Chlorophyll-Abbau und den generellen Nährstoff-Fluss aus dem seneszenten Blatt zurück in die Pflanze bis hin zum Abfallen des Blattes führen, werden eine Vielzahl Seneszenz assoziierter Gene (SAGs) induziert. Die Translationsprodukte dieser Gene sind an der Makromoleküldegradation, dem Nährstoff-Transport und an der Regulation dieser Prozesse beteiligt (Gepstein, 2004). Bei Überdauerungsorganen wie der Wurzelrübe der Zuckerrübe erfolgt nach der Vernalisation eine Art Seneszenz durch die Mobilisierung der Nährstoffe aus dem Speichergewebe (Nilsson, 2000).

In der vorliegenden Arbeit ist Transkript des SAGs *BvB12D* in 46 Tagen unter kontrollierten Bedingungen gelagerten Zuckerrüben identifiziert worden (Abbildung 18, Seite 62); *BvB12D* wird gleichermaßen in feldgelagertem Material nach 42 Tagen Lagerung induziert (Abbildung 19, Seite 63). Das ableitbare Translationsprodukt zeigt Homologie zu B12D-Proteinen. Erstmals isoliert wurde diese Protein-Klasse, deren physiologische Funktion ungeklärt ist, aus keimenden Gersten-Embryonen (Aalen *et al.*, 1994). In Blättern der Süßkartoffel wurde von Huang *et al.* (2001) ein Transkriptanstieg eines B12D-Proteins im Zuge der Seneszenz detektiert. Zu diesem B12D-Protein zeigt das ableitbare Translationsprodukt von *BvB12D* aus der Zuckerrübe die höchste Homologie. *BvB12D* zeigt die stärkste Expression bei hohen Lagerungstemperaturen von 28°C (Abbildung 18, Seite 62). Aus diesem Grund kann für das Protein *BvB12D* eine Funktion in der Bewältigung der entstandenen Temperatur-Stresssituation postuliert werden. Steigende Temperaturen führen zu erhöhter Atmungsaktivität und somit zum Saccharoseabbau. Dies ist ein Grund, warum zum Beispiel in mediterranem Klima gelagerte Zuckerrüben wesentlich früher nach der Ernte verarbeitet werden (van der Poel, 1998).

Da die physiologische Funktion der B12D-Proteine noch ungeklärt ist, kann der Grund für die Induktion zu späten Lagerungszeitpunkten nicht exakt geklärt werden. Wahrscheinlich erfolgt die Induktion aufgrund stattfindender Seneszenz-Prozesse oder auch im Zusammenhang mit Abwehrreaktionen in Folge einer Pathogenpenetration.

4.1.6 Modell der Nach-Ernte induzierten Genexpression bei Zuckerrüben

Abbildung 35 zeigt die Integration der potentiellen Funktionen Nach-Ernte induzierter Gene in ein Modell, welches mit dem physiologischen Zustand gelagerter Zuckerrüben korreliert. Demnach wird die Genexpression in maschinell geernteten und anschließend gelagerten Zuckerrüben von verschiedenen Stressfaktoren beeinflusst. Der vorliegende Verwundungsstress kann neben Wundheilungs- und Zellteilungsreaktionen (*BvCPRX1*, *BvPSK*, *BvRCC*, *BvMARB*) auch zur Jasmonat-vermittelten Infektionsprävention führen (*BvRIP-r1*, *BvRIP-r2*, *BvCPRX1*). Eine mögliche Pathogeninfektion induziert Gene, die in die R-Protein Signalkaskade (*BvHSP83*) oder die SAR-Reaktion involviert sind (*BvSP2*, *BvGLP-r*, *BvB12D*). Der erhöhte Wasserverlust führt zu Trockenstressantworten (*BvBPM1*) und die potentiell erhöhten ROS-Konzentrationen haben die Induktion von Genen ROS-abbauender Enzyme zur Folge (*BvC561R*, *BvCPRX1*). Eine mögliche Sprossung zum Ende der Lagerung kann wiederum von Zellteilungsreaktionen begleitet werden (*BvPSK*). Zudem liegen auch Hinweise auf mögliche Seneszenz-Prozesse vor (*BvB12D*).

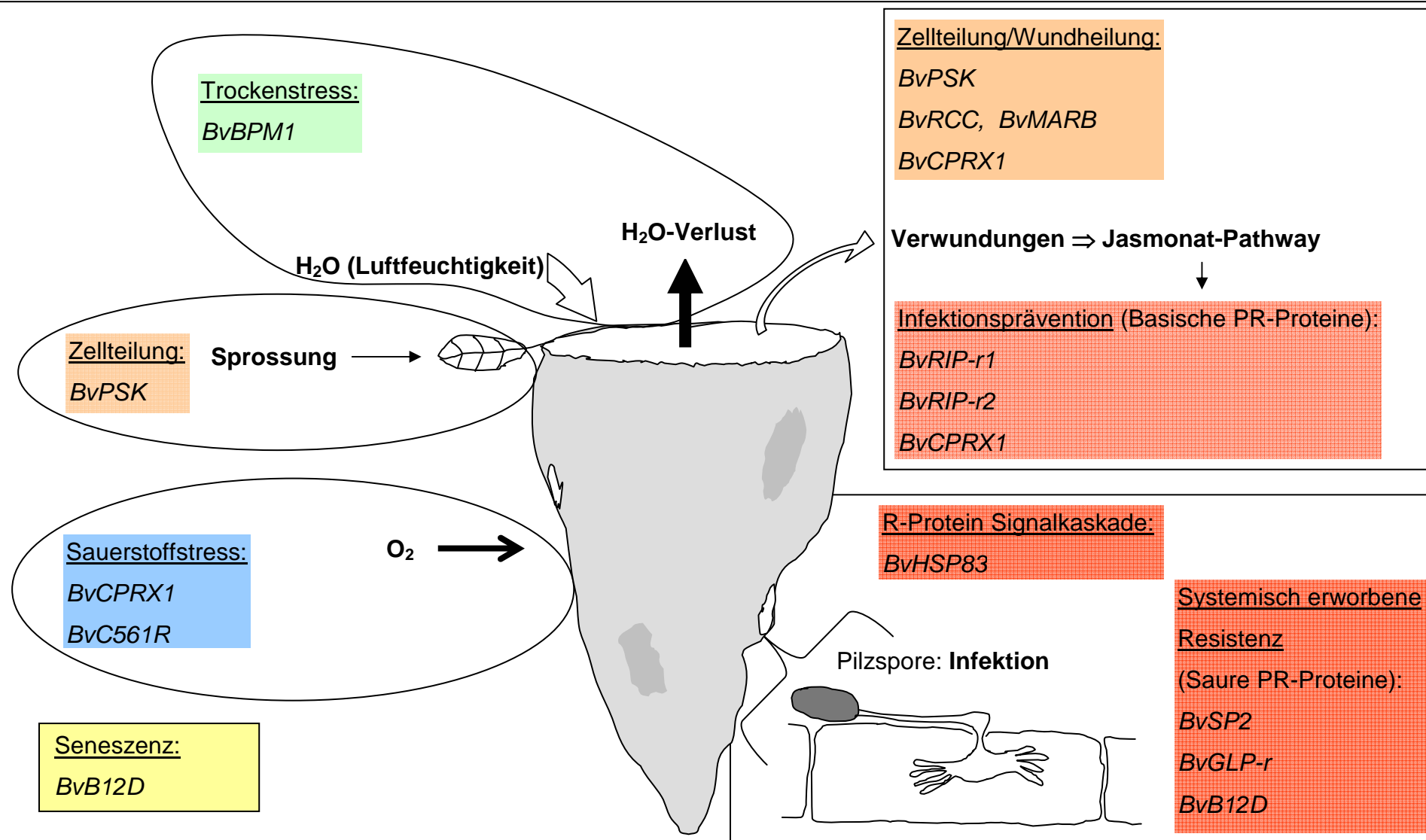


Abbildung 35: Integration der potentiellen Funktionen Nach-Ernte induzierter Gene in ein mit dem physiologischen Zustand gelagerter Zuckerrüben korrelierendes Modell.

4.1.7 Die Funktion des Nach-Ernte induzierten Gens *BvWDRP* lässt sich nicht eindeutig klären

Die Induktion der in den Kapiteln 4.1.1 - 4.1.5 erläuterten Gene ist anhand ihrer Homologien und des Induktionsprofils primär auf Stressantworten zurückzuführen. Die Funktion des Gens *BvWDRP*, dessen Translationsprodukt durch WD40-Domänen charakterisiert ist, kann nicht eindeutig geklärt werden. Proteine, welche eine strukturelle WD40-Domäne tragen, sind in unterschiedliche Prozesse wie Signaltransduktion, Cytoskellorganisation oder Proteintransport involviert (Smith *et al.*, 1999). Analysen von van Nocker und Ludwig (2003) zeigen, dass *A. thaliana* insgesamt 269 Proteine mit WD40-Domänen aufweist. Anhand der Zugehörigkeit des Translationsprodukts von *BvWDRP* zur WD40-Superfamilie kann keine Aussage über die Funktion in gelagerten Zuckerrüben getroffen werden. Die Tatsache, dass das Gen erst eine Woche nach der Ernte induziert wird (Abbildung 18, Seite 62), schließt eine Beteiligung an der Wundheilung jedoch aus.

4.1.8 Die Nach-Ernte induzierten Gene *BvNPCG1*, *BvNPCG2* und *BvNPCG3* sind möglicherweise nicht proteincodierend

Die Gene *BvNPCG1*, 2, und 3 besitzen keine längeren offenen Leseraster, die signifikante Homologien zu bekannten Proteinen aufweisen.

Wie in Kapitel 3.1.2.9 (Seite 58) gezeigt, weist das Gen *BvNPCG1* zwar im 2. Leseraster einen translatierbaren Bereich mit hoher Homologie zu einem Spleißosom ähnlichen Protein aus *A. thaliana* auf, da die Homologie jedoch nur einen Teil des C-Terminus umfasst und alle Leseraster mit zahlreichen Stopcodons versehen sind, inklusive des homologen Bereichs, kann nicht davon ausgegangen werden, dass allein aus dieser cDNA ein funktionelles Protein entsteht. Im Gegensatz zu *BvNPCG1* konnte bei *BvNPCG2* keinerlei Homologie nachgewiesen werden.

Die RT-PCR Experimente zum Nachweis des Nach-Ernte induzierten Gens *BvNPCG3* in gelagerten Zuckerrüben detektieren zwei mRNA Varianten (Abbildung 22, Seite 65), eine gespleißte Form und eine intronhaltige Variante, letztere ist auch vor der Ernte detektierbar. Das Gen zeigt keine signifikante Homologie zu bekannten Sequenzen und die drei Leseraster beider Varianten sind mit zahlreichen Stopcodons versehen, welche die sichere Postulation eines Translationsprodukts nicht zulassen.

Interessant ist die offensichtlich temperaturabhängige Regulation des Spleißens von *BvNPCG3*. Bei Lagerungstemperaturen von 28°C/26°C wird vornehmlich das gespleißte Transkript detektiert (Abbildung 22, Seite 65). Bei höheren Temperaturen liegt demnach auch eine erhöhte Spleiß-Aktivität vor. Demgegenüber wird *BvNPCG3* in feldgelagerten Zuckerrüben, die teilweise Temperaturen von 0°C ausgesetzt waren, kaum gespleißt. Im RT-PCR-Experiment wird hauptsächlich die ungespleißte Variante detektiert (Abbildung 23, Seite 66). Vermutlich liegt hier auch der Grund, warum vor der Ernte nur die ungespleißte mRNA detektiert wurde. Zum Zeitpunkt der Ernte lagen niedrigere Temperaturen als bei der anschließenden kontrollierten Lagerung vor, so dass erst unter diesen Bedingungen (17°C) auch die gespleißte Variante entstehen konnte. Die beobachtete reduzierte Spleiß-Aktivität bei niedrigen Temperaturen korreliert mit den Ergebnissen von Mastrangelo *et al.* (2005), die eine kälteinduzierte Retention der Introns bei zwei *e-cor*-Genen (early cold-regulated) beobachteten. Fung *et al.* (2005) berichten über eine Intron-Retention bei zwei AOX-Genen (Alternative Oxidase) im Zuge der Lagerung von Tomaten (*Lycopersicon esculentum*) bei tiefen Temperaturen. Die Tatsache, dass Kälte generell einen Einfluss auf das alternative Spleißen hat, wurde von Iida *et al.* (2004) bei *A. thaliana* gezeigt. Hier sind primär kälteinduzierbare Spleiß-Faktoren betroffen, die dann wiederum einen Einfluss auf das alternative Spleißen auf gesamter Transkriptomenebene haben können. Da die Funktion des *BvNPCG3*-Gens in der Zuckerrübe noch unbekannt ist und das Gen vermutlich nicht proteincodierend ist, können über die Auswirkungen des temperaturabhängigen Spleißens nur Hypothesen aufgestellt werden. Im folgenden Kapitel 4.1.9 wird eine mögliche Funktion des *BvNPCG3*-Gens als potentieller microRNA-Vorläufer diskutiert.

Zur weiteren Analyse der temperaturabhängigen Spleiß-Regulation des *BvNPCG3*-Gens sind *A. thaliana* Überexpressionslinien der intronhaltigen cDNA unter Kontrolle des 35S-Promotors erstellt worden (Kapitel 2.19, Seite 37). In ersten Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass das Spleißen des *BvNPCG3*-Gens auch im heterologen System *A. thaliana* bei Standardkultivierungsbedingungen von 22°C erfolgt (Jeannette Kappler, pers. Mitteilung). In ausstehenden Analysen soll gezeigt werden, ob die in der Zuckerrübe beobachteten Effekte der erhöhten Spleiß-Aktivität bei 28°C/26°C und der verminderten Aktivität bei ca. 0°C auch in *A. thaliana* bei diesen Temperaturen reproduziert werden können.

4.1.9 Codiert *BvNPCG3* eine microRNA?

Hinsichtlich der Gene *BvNPCG1*, *BvNPCG2* und *BvNPCG3* muss noch in Betracht gezogen werden, dass das jeweilige Transkript, welches offenbar nicht proteincodierend ist, eine regulatorische Funktion innehaben kann. In diesem Kontext ist vor allem das Phänomen der RNA-Interferenz zu nennen, welches in Pflanzen auf drei Mechanismen beruht (Baulcombe, 2004 und 2005). Allen Mechanismen ist die Beteiligung kleiner doppelsträngiger RNA-Fragmente von 21-26 Nukleotiden Länge, entstanden durch die Dicer-abhängige Spaltung doppelsträngiger RNA (dsRNA), gemeinsam. Das Enzym Dicer ist eine dsRNA-abhängige Nuklease mit RNaseIII-Domänen. Der erste Mechanismus des cytoplasmatischen siRNA silencing (small interfering RNA) spielt im gegebenen Zusammenhang der Nach-Ernte induzierten Genexpression bei Zuckerrüben vermutlich keine Rolle. Dieser Weg ist vor allem beim Virus induzierten Gene-Silencing (VIGS) von Bedeutung (Baulcombe, 2004). Die Frage, ob die nicht proteincodierenden Transkripte der Gene *BvNPCG1*, *BvNPCG2* und *BvNPCG3* eine regulatorische Funktion innehaben, kann im Kontext des zweiten RNA-Interferenz-Mechanismus diskutiert werden. Dieser beruht darauf, dass endogene Transkripte pflanzlicher Gene, die durch Haarnadelstrukturen (hairpin) doppelsträngige Bereiche bilden, Dicer-abhängig zu so genannten miRNAs (microRNA) prozessiert werden. Die entstandenen doppelsträngigen miRNAs sind auf einem Strang homolog zu Sequenzabschnitten der zu regulierenden Gene. Nach Einbindung des regulatorisch wirksamen miRNA-Sequenzstrangs in den RISC-Komplex (RNA induced silencing complex) erfolgt die Inhibierung des entsprechenden Zielgens durch Abbau des Transkripts, das Stoppen der Translation oder auch die Veränderung der pre-mRNA-Prozessierung (Chen, 2005; Wilton und Fletcher, 2005). Für *A. thaliana* liegen in der miRBase-Datenbank (Griffith-Jones, 2004), einer Sammlung für miRNA-Sequenzen, zur Zeit 117 Annotationen vor.

Unter Anwendung der Restriktionen zur miRNA-Detektion nach Lindow und Krogh (2005) konnten mittels des RNA-Sekundärstruktur-Prädiktionsprogramms "RNAstructure" (Mathews, 2004) für *BvNPCG1* und *BvNPCG2* keine Vorläuferstrukturen für eine miRNA detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Das *BvNPCG3*-Transkript hingegen weist eine solche miRNA-Vorläuferstruktur auf. Die RNA-Sekundärstruktur-Analyse führt zur Prädiktion einer Haarnadelstruktur aus *BvNPCG3* (Abbildung 17, Seite 59), aus welcher nach Dicer-abhängiger Spaltung

eine regulatorische miRNA entstehen kann. Diese miRNA würde jedoch nur aus der ungespleißten *BvNPCG3* mRNA gebildet, da ein Sequenzabschnitt des Vorläufermoleküls im Intron liegt. Homologievergleiche in *A. thaliana* zeigen, dass die potentielle miRNA komplementäre Basenpaarungen mit Transkripten von Transkriptionsfaktoren wie dem MADS-Box Protein AGL11 (AGAMOUS-like 11) oder Zink-Finger Proteinen eingehen kann. Laut Jones-Rhoades und Bartel (2004) sind eine Vielzahl von miRNAs an der Regulation von Transkriptionsfaktoren beteiligt. Im gegebenen Fall lägen die postulierten komplementären Basenpaarungen zwischen miRNA und Zieltranskript in Exon- wie auch in Intronbereichen (Tabelle 17, Seite 60). Demnach wäre eine Regulation in Form des RISC-vermittelten mRNA-Abbaus denkbar, wie auch eine Regulation auf der Ebene des pre-mRNA Spleißens (Wilton und Fletcher, 2005). Eine konkrete Aussage, welche Zielgene in *Beta vulgaris* durch die potentielle miRNA reguliert würden, ist nicht zu treffen, da die exakte Sequenz der miRNA nicht bekannt ist. Es besteht zwar oft ein hoher phylogenetischer Konservierungsgrad zwischen miRNAs verschiedener Spezies (Reinhart *et al.*, 2002), es liegen aber auch Vorhersagen über eine Vielzahl nicht konservierter miRNAs in *A. thaliana* vor (Lindow und Krogh, 2005).

Im Kontext des beobachteten temperaturabhängigen Spleißens bei *BvNPCG3* können allerdings Hypothesen über die miRNA-Zielgene in *Beta vulgaris* aufgestellt werden. Es wurde gezeigt, dass niedrige Temperaturen zu einer verminderten Spleiß-Aktivität führen. Unter diesen Bedingungen würde sich die miRNA-Vorläuferstruktur ausbilden, weil das hierzu notwendige Intron noch vorhanden ist. Die Stabilität der Vorläuferstruktur könnte durch niedrige Temperaturen positiv beeinflusst werden. Diesbezüglich existieren Modelle, die einen Einfluss von pre-mRNA-Sekundärstrukturen auf die Spleiß-Aktivität *in vivo* postulieren (Buratti und Baralle, 2004). Nach der Prozessierung des Vorläufers zur miRNA könnte diese zum Beispiel zur Repression von Transkriptionsfaktoren führen, die das Wachstum aufrechterhalten. Durch deren Inhibierung würde möglicherweise der kältebedingte Dormanzzustand eingeleitet. Die miRNA könnte auch regulatorisch am Übergang von der vegetativen in die generative Entwicklungsphase beteiligt sein. Bei Zuckerüben erfolgt dieser Übergang nur nach einer Kälteeinwirkung (Vernalisation). Bei *A. thaliana* wurde gezeigt, dass unter anderem die Repression des MADS-Box-Gens *FLC* im Zuge der Vernalisation erfolgt (Michaels und Amasino, 1999). *FLC* reprimiert während des vegetativen Wachstums die Blütenbildung. Diese Ergebnisse

stehen möglicherweise in direktem Zusammenhang zur Homologie der *BvNPCG3* miRNA zum MADS-Box Protein AGL11 aus *A. thaliana*, wenngleich dieses die Blütenbildung bei *A. thaliana* positiv reguliert und nicht reprimiert (Rounsley *et al.*, 1995).

Es sind weitere Szenarien denkbar, die die Regulation von Genen durch eine kälteabhängig gebildete miRNA beschreiben. Solange die miRNA-Zielgene jedoch nicht bekannt sind, fehlt solchen Modellen die Grundlage. Daher wird in ausstehenden Analysen der miRNA-Nachweis und die Zielgen-Identifizierung angestrebt.

4.2 Die bioinformatische Analyse der Promotoren P-*BvHSP83*, P-*BvCPRX1*, P-*BvRIP-r1* und P-*BvNPCG2* deutet auf keinen gemeinsamen Regulationsmechanismus hin

Unter dem Aspekt, dass Gene mit ähnlichem Expressionsmuster einer gemeinsamen Regulation unterliegen, wurden die putativen Promotorbereiche von vier durchgehend exprimierten Nach-Ernte induzierten Genen isoliert und die Sequenzen bioinformatisch analysiert.

Als Gemeinsamkeit konnte in den Promotorsequenzen der Gene *BvHSP83*, *BvCPRX1*, *BvRIP-r1* und *BvNPCG2* eine TATA-Box detektiert werden (Abbildung 29, Seite 73). Nach Molina und Grotewold (2005) besitzen im Vergleich dazu nur knapp ein Drittel der bekannten *A. thaliana* Promotoren eine TATA-Box. Ob diese ein Charakteristikum für Nach-Ernte induzierbare Promotoren darstellt, kann aufgrund der kleinen Stichprobenzahl allerdings nicht gesagt werden.

Um mögliche *cis*-regulatorische Elemente, die von Transkriptionsfaktoren gebunden werden, zu identifizieren, sind zwei bioinformatische Ansätze verfolgt worden. Zum einen die Identifizierung bekannter Transkriptionsfaktorbindungsstellen (Kapitel 3.4.1) und zum anderen die Identifizierung unbekannter *cis*-regulatorischer Elemente inklusive möglicher interagierender Proteine (Kapitel 3.4.2 - 3.4.4).

Die matrizenbasierte Suche nach bekannten Transkriptionsfaktorbindungsstellen detektiert keine Bindungsstelle, die nur in Nach-Ernte induzierbaren Promotoren vorliegt aber nicht in den Referenzpromotoren, die keine Nach-Ernte Induktion zeigen. Demgegenüber liegt auch keine Gegenselektion vor. Es wurden keine TFB-sites identifiziert, die nur in den Referenzsequenzen vorliegen (Tabelle 18, Seite 77). Zur Identifizierung gemeinsamer, unbekannter *cis*-regulatorischer Elemente wurde eine vergleichende Promotoranalyse durchgeführt. Es wurde ein 7bp-Motiv, wiedergegeben durch die Matrize *Bv-L7* (Abbildung 30, Seite 79), detektiert, welches signifikant häufiger in den vier Nach-Ernte induzierbaren Promotoren als in vergleichbaren Zufallssequenzen auftritt. In drei Promotoren (P-*BvCPRX1*, P-*BvRIP-r1*, P-*BvNPCG2*) liegt das Motiv in konserviertem Abstand von 140-180bp upstream zur TATA-Box jeweils auf dem nicht codierenden DNA-Strang (Tabelle 19, Seite 78). Diese Colokalisation mit der TATA-Box lässt eine mögliche regulatorische Funktion vermuten. Interaktionen zwischen TBP und induzierbaren Transkriptionsfaktoren sind hinlänglich bekannt (Le Gourriercet *et al.*, 1999; Reindl und Schoffl, 1998). Demnach kann postuliert werden, dass das 7bp-Motiv im Zuge der Nach-Ernte Induktion

regulatorisch von Bedeutung ist. In einem One-Hybrid Screen ist jedoch kein interagierendes Protein, translatiert aus einer auf Nach-Ernte induzierte Gene angereicherten cDNA-Population, isoliert worden.

Da *cis*-regulatorische Elemente nicht zwangsläufig upstream der TATA-Box oder des Transkriptionsstartpunkts lokalisiert sind, wurden auch 5'-UTRs Nach-Ernte induzierter Gene auf gemeinsame *cis*-Sequenzen analysiert. Es existieren zahlreiche Beispiele für die regulatorische Funktionalität von 5'-UTR- und Intronsequenzen, welche die Genexpression auf der Transkriptionsebene beeinflussen (Vitale *et al.*, 2003, Sakamoto *et al.*, 2001; Hultzink *et al.*, 2003). Zudem können 5'-UTRs noch Sequenzen aufweisen, die von regulatorischen Proteinen nach der Transkription gebunden werden und die Translation beeinflussen (Wilkie *et al.*, 2003). Es wurde ein 5bp Motiv identifiziert, das signifikant häufiger in den 5'-UTRs Nach-Ernte induzierter Gene vorliegt als in UTR-Sequenzen von zwei Referenzdatensätzen, bestehend aus Sequenzen nicht-Nach-Ernte induzierter Gene und Sequenzen verschiedener pflanzlicher Spezies (Kapitel 3.4.3 und 3.4.4). Aufgrund dieser Signifikanz ist in einem One-Hybrid Screen die Isolierung eines interagierenden Proteins mit dem 5bp-Motiv, repräsentiert durch die Matrize Bv-L9 (Abbildung 31, Seite 82), angestrebt worden. Auch in diesem Fall führte der Screen nicht zur Detektion eines interagierenden Proteins.

Der Anspruch an die bioinformatische Analyse, bekannte bzw. unbekannte TFB-sites oder deren Gegenselektion zu identifizieren, um eine Verbindung zur Nach-Ernte Induktion herzustellen, muss sehr kritisch betrachtet werden. Gelagerte Zuckerrüben bestehen aus vielen Gewebetypen, wie Parenchymen, Leitgeweben (Xylem, Phloem), der Endodermis oder dem Wundperiderm. Die analysierten Promotoren weisen als Gemeinsamkeit die Nach-Ernte Induzierbarkeit bei ähnlichem Expressionsprofil auf und vermitteln vornehmlich die Expression in der Wurzelrübe. Angesichts der Tatsache, dass die Identifizierung wie auch die Aufnahme der Expressionsprofile anhand unseparierter Transkripte aus allen Geweben der geernteten Wurzelrübe erfolgte, wird klar, dass zum Beispiel gewebespezifische *cis*-Elemente so nicht identifiziert werden konnten (Brandt, 2005). Oltmanns (2005) hat drei Promotoren analysiert, die primär in der Wurzelrübe eine Expression vermitteln. Durch Promotor-Reportergenanalysen konnte die Gewebespezifität der Promotoren aufgezeigt werden. Ein Thaumatin-like-protein (*Tlp*) Promotor vermittelt vornehmlich

die Expression im xylemumgebenden Parenchym. Gleiches gilt für einen Linker-Histon (*His1-r*) Promotor, während ein Major-latex-like protein (*Mll*) Promotor in nahezu allen Geweben der Wurzelrübe aktiv ist. Diese Daten zeigen die Notwendigkeit, mittels Promotor-Reportergenanalysen den exakten Ort der Expressionsvermittlung auch für die Nach-Ernte induzierbaren Promotoren *P-BvHSP83*, *P-BvCPRX1*, *P-BvRIP-r1* und *P-BvNPCG2* zu bestimmen (Kapitel 2.18). Die Ergebnisse dieser Analysen stehen zum jetzigen Zeitpunkt noch aus.

Gegen die Identifizierung gemeinsamer *cis*-regulatorischer Sequenzen in den Nach-Ernte induzierbaren Promotoren spricht generell die Tatsache, dass der eigentliche Induktionsstimulus nicht bekannt ist. Der aus physiologischer Sicht nicht natürliche Zustand der Lagerung kann nicht als Stimulus betrachtet werden. Die Heterogenität der Proteinfunktionen Nach-Ernte induzierter Gene (Kapitel 4.1) lässt auf mehrere Stimuli schließen, die zur Induktion der einzelnen Gene führen. In diesem Kontext sind Stresszustände wie Verwundung, Wasserverlust, erhöhte Sauerstoffkonzentration sowie Pathogenabwehr bzw. Infektionsprävention zu nennen. Die ableitbaren Translationsprodukte der vier Gene, deren Promotoren bioinformatisch analysiert wurden, können zwar alle mit der Pathogenabwehr in Verbindung gebracht werden, demgegenüber sind die einzelnen Induktionsstimuli aber vermutlich unterschiedlich.

4.3 Biotechnologische Anwendung des Nach-Ernte induzierbaren Promotors *P-BvRIPr1*

Neben dem Nachweis differentieller Genexpression in gelagerten Zuckerrüben und der zugehörigen Ursachenanalyse, war ein weiteres Ziel der Arbeit die Identifizierung Nach-Ernte induzierbarer Promotoren im Hinblick auf die biotechnologische Verbesserung der Lagerungseigenschaften von Zuckerrüben. Ob die identifizierten Promotoren *P-BvHSP83*, *P-BvCPRX1*, *P-BvRIP-r1* und *P-BvNPCG2* tatsächlich dieses Potential besitzen, kann mithilfe der in *Beta vulgaris* transformierten Promotor-Reportergenkonstrukte zukünftig gezeigt werden (Kapitel 2.18). Anhand der im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen Expressionsprofile erweist sich das Gen *BvRIP-r1* als besonders interessant hinsichtlich der biotechnologischen Nutzung des Promotors zur Nach-Ernte Induktion. *BvRIP-r1* wird während des Zuckerrübenwachstums kaum exprimiert (Abbildung 27, Seite 69) und aufgrund der Homologie des Translationsprodukts zu einem basischen PR-Protein kann postuliert

werden, dass im Zuge der Entwicklung auch keine Induktion erfolgt, solange keine Infektionen oder Verwundungen vorliegen. Nach der Ernte werden hohe *BvRIP-r1*-Transkriptlevel zu Beginn und zum Ende der Lagerungsperiode von 46 Tagen nachgewiesen (Abbildung 25, Seite 68). In der Zuckerrübenmiete wird das Gen vor allem zum Ende des beobachteten Lagerungszeitraums von 49 Tagen exprimiert (Abbildung 26, Seite 69).

Im Hinblick auf die Analysen von Rosenkranz *et al.* (2001) bezüglich der lagerungsbedingten Invertzuckerakkumulation durch die vakuoläre Invertase VI-1 könnte der Promotor *P-BvRIP-r1* zu einer gezielten Transgenexpression nach der Ernte eingesetzt werden, um die Invertase VI-1 zu inhibieren. Tang *et al.* (1999) haben an Karotten gezeigt, dass eine konstitutive Inhibierung vakuolärer Invertasen zu einem abnormen Wachstumsverhalten führt. Demnach ist die bedarfsgerechte Expression eines spezifischen RNAi-Konstrukts, einer Antisense-RNA oder eines Invertase-Inhibitor-Gens nach der Ernte zur VI-1-Inhibierung indiziert. Eine Inhibierung der vakuolären Invertase VI-1 ist vor allem bei langen Lagerungszeiten anzustreben, da auch nach Abschluss der Wundheilung noch ein hoher VI-1-Transkriptlevel nachzuweisen ist (Rosenkranz *et al.*, 2001).

Für weitere biotechnologische Anwendungen, wie zum Beispiel die Beeinflussung der α -Amino-N-Konzentrationen in gelagerten Zuckerrüben, muss individuell geklärt werden, welches Transgen für das erklärte Ziel geeignet ist und wie dessen Regulation erfolgen muss.

5 Zusammenfassung

Die Ernte von Pflanzenorganen führt bei anschließender Lagerung häufig zu Qualitätseinbußen. Zum besseren Verständnis der stoffwechselphysiologischen Vorgänge in gelagerten Zuckerrüben wurden Nach-Ernte induzierte Gene hinsichtlich Funktion und Regulation charakterisiert. Anhand der Expressionsprofile und der Nukleotidsequenzen von 16 Nach-Ernte induzierten Genen konnte ein Modell zur Funktion dieser Gene während eines 46 Tage langen Lagerungszeitraums erstellt werden.

Demnach wird die Genexpression durch verschiedene Stresszustände beeinflusst. Die Ernte von Zuckerrüben geht mit einer erheblichen Verwundung durch Abschneiden des Blattansatzes einher. Die resultierende Lignifizierung von Zellwänden bei der Ausbildung eines Wundperiderms erklärt die frühe Induktion des Peroxidase-Gens *BvCPRX1*. Die Expression von Genen, welche in Zellteilungsprozesse involviert sind, fügt sich in den Kontext der Wundperidermbildung ein. Zu nennen sind hier das *BvRCC*-Gen, welches an der Ausbildung des Spindelapparates während der Mitose beteiligt ist, das *BvMARB*-Gen, codierend für ein Matrix-attached-region-binding Protein und das *BvPSK*-Precursor-Gen des wachstumsstimulierenden Peptidhormons PSK- α . Die wachstumsstimulierende Wirkung von *BvPSK* wurde durch Überexpression im heterologen System *Arabidopsis thaliana* genauer untersucht. Die Überexpression führt im Vier- bis Sechsstadium zu durchschnittlich 35% größeren Blattflächen im Vergleich zum Wildtyp. Andere phänotypische Effekte wurden nicht beobachtet.

Die frühe Induktion basischer PR-Protein-Gene wie *BvRIP-r1* und *BvRIP-r2*, beide codierend für Ribosomen-inaktivierende Proteine mit potentiell antiviraler und antifungaler Wirkung, lässt auf eine jasmonatvermittelte systemische Aktivierung im Zuge der Verwundung schließen.

Die späte Induktion saurer PR-Protein-Gene deutet auf eine postinfektionelle Reaktion hin. Zu nennen sind hier das Chitinase-Gen *BvSP2*, das potentielle Oxalat-Oxidase-Gen *BvGLP-r* und das Seneszenz assoziierte Gen *BvB12D*. Bei gelagerten Zuckerrüben liegt durch den anhaftenden Erdbesatz ein stetes Inokulum bodenbürtiger Pilzsporen vor, die nach längerer Lagerungszeit zu einer Infektion führen können.

Neben dem offensichtlich vorliegenden Verwundungsstress, daraus resultierender Infektionsprävention oder tatsächlich vorliegender Pathogenpenetration, können

gelagerte Zuckerrüben noch weiteren Stresszuständen ausgesetzt sein. Die Induktion des Aquaporin-Gens *BvBPM1* deutet auf vorliegenden Trockenstress hin. Die Expression des Cytochrom-Oxidase-Gens *BvC561R* und des Peroxidase-Gens *BvCPRX1*, deren Translationsprodukte am Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt sein können, stellt eine aktive Zellantwort auf erhöhte Sauerstoffkonzentrationen dar. Die späte Induktion des *BvB12D*-Gens nach 46 Tagen Lagerung stellt ein Indiz für beginnende Seneszenz-Prozesse dar.

Besonders interessant ist zudem die Beobachtung des temperaturabhängigen Spleißens eines nicht proteincodierenden Gens (*BvNPCG3*). Die ungespleißte mRNA erfüllt verschiedene Kriterien eines microRNA Vorläufers. Hier könnte das kältereprimierte Spleißen mit der Regulation dieser microRNA zusammenhängen.

Um zu klären, ob eine Nach-Ernte Induktion durch gemeinsame, funktionell bekannte *cis*-regulatorische Motive in Nach-Ernte induzierbaren Promotoren bedingt sein könnte, wurden bioinformatische Analysen mit vier Promotoren von früh Nach-Ernte induzierten Genen durchgeführt. Solche Motive konnten nicht identifiziert werden, was auf die unterschiedlichen Induktionsstimuli der Genexpression bzw. die Gewebevielfalt innerhalb der Wurzelrübe zurückgeführt werden kann. Im Gegensatz dazu wurden zwei unbekannte, überrepräsentierte Motive detektiert, zu denen allerdings keine DNA-bindenden Proteine identifiziert werden konnten.

Da die Qualität der Zuckerrübe im Hinblick auf Extrahierbarkeit und Gehalt der gespeicherten Saccharose negativ durch die Lagerung beeinflusst wird, existieren Konzepte zur biotechnologischen Verbesserung der Lagerungsfähigkeit von Zuckerrüben. Hierzu werden Promotoren benötigt, die eine bedarfsgerechte Transgenexpression vermitteln. Der im Rahmen der Arbeit identifizierte Promotor des Gens *BvRIP-r1* könnte für die zielgerichtete Expression solcher Transgene eingesetzt werden. Anhand der aufgenommenen Expressionsprofile von *BvRIP-r1* wurde gezeigt, dass die Genexpression vornehmlich in der Wurzelrübe erfolgt. In der sich entwickelnden Pflanze liegt keine Expression vor und nach der Ernte wird *BvRIP-r1* sowohl unter kontrollierten Bedingungen im Labor als auch unter agronomisch relevanten Bedingungen in der Feldmiete relativ stark induziert.

6 Literatur

- Aalen, R.B., Opsahl-Ferstad, H.G., Linnestad, C., Olsen, O.A. (1994). Transcripts encoding an oleosin and a dormancy-related protein are present in both the aleurone layer and the embryo of developing barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. *Plant J.* 5, 385-396
- Achard, Franz Carl (1809). Die europäische Zuckerfabrikation aus Runkelrüben, Leipzig. Auszüge einzusehen in der Online Bibliothek des Deutschen Museums, München. http://www.deutschesmuseum.de/bib/entdeckt/alt_buch/text0100.htm
- Adams, D.J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150, 2029-2035
- Akker, S.A., Smith, P.J., Chew, S.L. (2001). Nuclear post-transcriptional control of gene expression. *J. Mol. Endocrinol.* 27, 123-131
- Alexander L., Grierson, D. (2002). Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 53, 2039-2055
- Amaya, I., Botella, M.A., de la Calle, M., Medina, M.I., Heredia, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quesada, M.A., Valpuesta, V. (1999). Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett.* 457, 80-84
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.P., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., Tuschl, T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9, 277-279
- Asard, H., Kapila, J., Verelst, W., Berczi, A. (2001). Higher-plant plasma membrane cytochrome b₅₆₁: a protein in search of a function. *Protoplasma* 217, 77-93
- Barone, L.M., Shih, C., Wasserman, B.P. (1997). Mercury-induced conformational changes and identification of conserved surface loops in plasma membrane aquaporins from higher plants. *J. Biol. Chem.* 272, 30672-30677
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363
- Baulcombe, D. (2005). RNA silencing. *Trends Biochem. Sci.* 30, 290-293
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., Dangl, J.L. (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 391-399
- Berghall, S., Briggs, S., Elsegood, S.E., Eronen, L., Kuusisto, J.O., Philip, E.J., Theobald, T.C., Walliander, P. (1996). The role of sugarbeet invertase and related enzymes during growth, storage and processing. *Zuckerindustrie* 122, 520-530
- Berglund, L., Brunstedt, J., Nielsen, K.K., Chen, Z., Mikkelsen, J.D., Marcker, K.A. (1995). A proline-rich chitinase from *Beta vulgaris*. *Plant Mol. Biol.* 27, 211-216
- Bernier, F., Berna, A. (2001). Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiol. Biochem.* 39, 545-554

- Bolwell, G.P., Butt, V.S., Davies, D.R., Zimmerlin, A. (1995). The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radic. Res.* 23, 517-532
- Brameld, K.A., Goddard, W.A. 3rd (1998). The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4276-4281
- Brandt, S.P. (2005). Microgenomics: gene expression analysis at the tissue-specific and single-cell levels. *J. Exp. Bot.* 56, 495-505
- Buchholz, K., Märlander, B., Puke, H., Glattkowski, H., Thielecke, K. (1995). Neubewertung des technischen Wertes von Zuckerrüben. *Zuckerindustrie* 120, 113-121
- Bugbee, W.M. (1993). Storage. In: The sugar beet crop: science into practice (Cooke, D.A, Scott, R.K., Herausgeber) Chapman and Hall, London, Seite 551-570
- Buratti, E., Baralle, F.E. (2004). Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10505-10514
- Carazo-Salas, R.E., Guarguaglini, G., Gruss, O.J., Segref, A., Karsenti, E., Mattaj, I.W. (1999). Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature* 400, 178-181
- Cessna, S.G., Sears, V.E., Dickman, M.B., Low, P.S. (2000). Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotinium*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell* 12, 2191-2200
- Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R., Chrispeels, M.J. (2000). Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol.* 122, 1025-1034
- Chen, X. (2005). MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett.* 579, 5923-5931
- Clough, S.J., Bent A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-43
- Coffin, R. H., Yada, Y., Parkin, K.L., Grodzinski, B., Stanley, D.W. (1987). Effect of low temperature storage on sugar concentrations and chip color of certain potato processing potato cultivars and selections. *J. Food Sci.* 52, 639-645
- Cortes, D.F., Reilly, K., Okogbenin, E., Beeching, J.R., Iglesias, C., Tohme, J. (2002). Mapping wound-response genes involved in post-harvest physiological deterioration (PPD) of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* 128, 47-53
- Coupe, S.A., Sinclair, B.K., Watson, L.M., Heyes, J.A., Eason, J.R. (2003). Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *J. Exp. Bot.* 54, 1045-1056

- Davies, K.M., King, G.A. (1993). Isolation and characterization of a cDNA clone for a harvest-induced asparagine synthetase from *Asparagus officinalis* L.. Plant Physiol. 102, 1337-1340
- Davies, K.M., Seelye, J.F., Irving, D.E., Borst, W.M., Hurst, P.L., King, G.A. (1996). Sugar regulation of harvest-related genes in asparagus. Plant Physiol. 111, 877-883
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., and Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants. Nucleic Acids Res. 13, 4777-4788
- de los Reyes, B.G., McGrath, J.M., Myers, S., Derrico, C. (2000). Differential gene expression in sugar beet seedlings (*Beta vulgaris*) germinated under stress conditions. Unveröffentlicht, GenBank Acc. Nr. AW697769 [cDNA clone similar to Glyceraldehyde 3-Phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA sequence]
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., Siebert, P.D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6025-6030
- Donaldson, P.A., Anderson, T., Lane, B.G., Davidson, A.L., Simmonds, D.H. (2001). Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from wheat gf-2,8 (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. Physiol. Mol. Plant Path. 59, 297-307
- Dumas B., Freyssinet G., Pallett K. (1995). Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings. Plant Physiol. 107, 1091-1096
- Durrant, W.E., Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 42, 185-209
- Edgell, T., Brierley, E.R., Cobb, A.H. (1998). An ultrastructural study of bruising in stored potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. Ann. Appl. Biol. 132, 143-150
- Elliot, M.C., Weston, G.D. (1993). Biology and Physiology of the Sugar-beet Plant. In: The sugar beet crop: science into practice (Cooke, D.A, Scott, R.K., Herausgeber) Chapman and Hall, London, Seite 37-66
- Endo, Y., Tsurugi, K. (1987). RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. J. Biol. Chem. 262, 8128-8130
- Fabbri, A.A., Fanelli, C., Reverberi, M., Ricelli, A., Camera, E., Urbanelli, S., Rossini, A., Picardo, M., Altamura, M.M. (2000). Early physiological and cytological events induced by wounding in potato tuber. J. Exp. Bot. 51, 1267-1275
- Fonne-Pfister, R., de Marco, A. and Volrath, S.L. (2001). Protoporphyrinogen oxidase (protox) genes. Patent: WO 0168826-A 26; Syngenta Participations AG (CH)

- Fujimoto, S., Matsunaga, S., Yonemura, M., Uchiyama, S., Azuma, T., Fukui, K. (2004). Identification of a novel plant MAR DNA binding protein localized on chromosomal surfaces. *Plant Mol. Biol.* 56, 225-239
- Fung, R.W., Wang, C.Y., Smith, D.L., Gross, K.C., Tao, Y., Tian, M. (2005). Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes. *J. Plant Physiol.* [Epub ahead of print; www.doi.org, doi:10.1016/j.jplph.2005.11.003]
- Galindo, F. G., Herppich, W., Gekas, V., and Sjöholm, I. (2004). Factors affecting quality and postharvest properties of vegetables: Integration of water relations and metabolism. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 139-154
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: John M. Walker (Hrsg.): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 571-607
- Gautier, T., Berges, T., Tollervey, D., Hurt, E. (1997). Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 7088-7098
- Gepstein, S. (2004). Leaf senescence - not just a 'wear and tear' phenomenon. *Genome Biol.* 5, 212
- Giovannoni J.J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16, S170-180
- Girbes, T., de Torre, C., Iglesias, R., Ferreras, J.M. (1996). RIP for viruses. *Nature* 379, 777-778
- Gonzalez, M.C. (2002). Cloning and expression of intracellular invertases from sugar beet. Unveröffentlicht, GenBank Acc. Nr. AJ422050 (*Beta vulgaris* mRNA for neutral invertase, ninv gene)
- Greiner, S., Krausgrill, S., Rausch, T. (1998). Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor. Proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development. *Plant Physiol.* 116, 733-742
- Greiner, S., Rausch, T., Sonnewald, U., Herbers, K. (1999). Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. *Nat. Biotechnol.* 17, 708-711
- Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* 32, D109-11
- Hamilton, A. J., Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952
- Hanai, H., Matsuno, T., Yamamoto, M., Matsubayashi, Y., Kobayashi, T., Kamada, H., Sakagami, Y. (2000). A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant Cell. Physiol.* 41, 27-32

- Hennig, W. (1995). Genetik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Hennion, S., Little, A.C.H., Hartmann, C. (1992). Activities of enzymes involved in lignification during the postharvest storage of etiolated asparagus spears. *Physiol. Plant.* 86, 474-478
- Hertz, G.Z., Stormo, G.D. (1999). Identifying DNA and protein patterns with statistically significant alignments of multiple sequences. *Bioinformatics* 15, 563-577
- Hesse, H., Willmitzer, L. (1996). Expression analysis of a sucrose synthase gene from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Mol. Biol.* 30, 863-872
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res.* 27, 297-300
- Holm, K.B., Andreasen, P.H., Eckloff, R.M., Kristensen, B.K., Rasmussen, S.K. (2003). Three differentially expressed basic peroxidases from wound-lignifying *Asparagus officinalis*. *J. Exp. Bot.* 54, 2275-2284
- Hofmann, K., Stoffel, W. (1993). TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 166
- Huang, Y.J., To, K.Y., Yap, M.N., Chiang, W.J., Suen, D.F., Chen, S.C. (2001). Cloning and characterization of leaf senescence up-regulated genes in sweet potato. *Physiol. Plant.* 113, 384-391
- Hulzink, R.J., Weerdesteyn, H., Croes, A.F., Gerats, T., van Herpen, M.M., van Helden, J. (2003). In silico identification of putative regulatory sequence elements in the 5'-untranslated region of genes that are expressed during male gametogenesis. *Plant Physiol.* 132, 75-83
- Hurkman, W.J., Tanaka, C.K. (1996). Germin gene expression is induced in wheat leaves by powdery mildew infection. *Plant Physiol.* 111, 735-739
- Iida, K., Seki, M., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Toyoda, T., Konagaya, A., Shinozaki, K. (2004). Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing in *Arabidopsis thaliana* based on full-length cDNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 32, 5096-5103
- Imura, E., Hayasaka, M., Saito, H. Kanzawa, K. (1986). Relation between mechanical damage and storability in sugar beets. 1. Influence of root damage given in the harvesting and piling processes on the quality of stored sugar beets. *Proc. Sugar Beet Res. Assoc. Japan* 28, 108-114
- Jaggard, K.W., Clark, C.J.A., May, M.J., McCullagh, S., Draycott, A.P. (1997). Changes in the weight and quality of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) roots in storage clamps on farms. *J. Agr. Sci.* 129, 287-301
- Jaggard, K.W., Clark, C.J.A., Draycott, A.P. (1999). The weight and processing quality of components of the storage roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Sci. Food Agric.* 79, 1389-1398

- Jang, J.Y., Kim, D.G., Kim, Y.O., Kim, J.S., Kang, H. (2004). An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 54, 713-725
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol. Cell.* 14, 787-799
- Jorgensen, R. (1990). Altered gene expression in plants due to trans-interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol.* 8, 340-344
- Kahl, G. (1978). *Biochemistry of Wounded Plant Tissues*. De Gruyter Verlag. Berlin, New York
- Kawaguchi, R., Bailey-Serres, J. (2005). mRNA sequence features that contribute to translational regulation in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* 33, 955-65
- Kawaoka, A., Kawamoto, T., Moriki, H., Ohta, H., Sekine, M., Takano, M., Shinmyo, A. (1994). Growth stimulation of tobacco plant introduced the horseradish peroxidase gene prxC1a. *J. Ferment. Bioengineer.* 78, 49-53
- Kasprzewska, A. (2003). Plant chitinases – regulation and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8, 809-24
- Keller, E.R.; Hanus, H.; Heyland K.-U. (1999). *Handbuch des Pflanzenbaues. Band 3: Knollen- und Wurzelfrüchte, Körner- und Futterleguminosen*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Kloos, D.U., Oltmanns, H., Dock, C., Stahl, D., Hehl, R. (2002). Isolation and molecular analysis of six taproot expressed genes from sugar beet. *J. Exp. Bot.* 53, 1533-1534
- Koncz, C. und Schell, J. (1986). The promotor of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204, 383-396
- Lagrimini, L.M., Bradford, S., Rothstein, S. (1990). Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 2, 7-18
- Lamb, C., Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275
- Lane, B.G. (1994). Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. *FASEB J.* 8, 294-301
- Le Gourrierc, J., Li, Y.F., Zhou, D.X. (1999). Transcriptional activation by *Arabidopsis* GT-1 may be through interaction with TFIIA-TBP-TATA complex. *Plant J.* 18, 663-668

- Lehr, A., Kirsch, M., Viereck, R., Schiemann, J., Rausch, T. (1999). cDNA and genomic cloning of sugar beet V-type H⁺-ATPase subunit A and c isoforms: evidence for coordinate expression during plant development and coordinate induction in response to high salinity. *Plant Mol. Biol.* 39, 463-475
- Leon, J., Rojo, E., Sanchez-Serrano, J.J. (2001). Wound signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 52, 1-9
- Lewin, B. (1998). *Molekularbiologie der Gene*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Li, L., Strahwald, J., Hofferbert, H., Lübeck, J., Tacke, E., Junghans, H., Wunder, J., Gebhardt, C. (2005). DNA Variation at the Invertase Locus *invGE/GF* Is Associated With Tuber Quality Traits in Populations of Potato Breeding Clones. *Genetics* 170, 813-821
- Liechti, R., Farmer, E.E. (2002). The jasmonate pathway. *Science* 296, 1649-1650
- Lindow, M., Krogh, A. (2005). Computational evidence for hundreds of non-conserved plant microRNAs. *BMC Genomics* 6:119
- Link, M., Rausch, T., Greiner, S. (2004). In *Arabidopsis thaliana*, the invertase inhibitors AtC/VIF1 and 2 exhibit distinct target enzyme specificities and expression profiles. *FEBS Lett.* 573, 105-109
- Lippard, S.J., Berg J.M. (1995). *Bioanorganische Chemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Lopez-Serrano, M., Fernandez, M.D., Pomar, F., Pedreno, M.A., Ros Barcelo A. (2004). *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. *J. Exp. Bot.* 55, 423-431
- Lorbiecke, R., Sauter, M. (2002). Comparative analysis of PSK peptide growth factor precursor homologs. *Plant Sci.* 163, 321-332
- Lorbiecke, R., Steffens, M., Tomm, J.M., Scholten, S., von Wiegen, P., Kranz, E., Wienand, U., Sauter, M. (2005). Phytosulphokine gene regulation during maize (*Zea mays* L.) reproduction. *J. Exp. Bot.* 56, 1805-1819
- Lu, R., Malcuit, I., Moffett, P., Ruiz, M.T., Peart, J., Wu, A.J., Rathjen, J.P., Bendahmane, A., Day, L., Baulcombe, D.C. (2003). High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J.* 22, 5690-5699
- Lusser, A. (2002). Acetylated, methylated, remodeled: chromatin states for gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 437-443
- Mastrangelo, A.M., Belloni, S., Barilli, S., Ruperti, B., Di Fonzo, N., Stanca, A.M., Cattivelli, L. (2005). Low temperature promotes intron retention in two *e-cor* genes of durum wheat. *Planta* 221, 705-715

- Mathews, D.H., Disney, M.D., Childs, J.L., Schroeder, S.J., Zuker, M., Turner, D.H. (2004). Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7287-7292
- Matsubayashi, Y., Sakagami, Y. (1996). Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7623-7627
- Matsubayashi, Y., Hanai, H., Hara, O., Sakagami, Y. (1996). Active fragments and analogs of the plant growth factor, phytosulfokine: structure-activity relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**, 209-214
- Matsubayashi, Y., Takagi, L., Omura, N., Morita, A., Sakagami, Y. (1999). The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine- α stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of *zinnia*. *Plant Physiol.* **120**, 1043-1048
- Matsubayashi, Y. (2003). Ligand-receptor pairs in plant peptide signaling. *J. Cell. Sci.* **116**, 3863-3870
- Michaels, S.D., Amasino, R.M. (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell.* **11**, 949-956
- Molina, C., Grotewold, E. (2005). Genome wide analysis of *Arabidopsis* core promoters. *BMC Genomics* **6**:25
- Mumford, D.L., Wyse, R.E. (1976). Effect of fungus infection on respiration and reducing sugar accumulation of sugarbeet roots and use of fungicides to reduce infection. *J. Am. Soc. Sugar Beet Technol.* **19**, 157-162
- Mülhardt, C. (2002). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Munk, K. (2001). *Grundstudium Biologie: Botanik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin
- Nakai, K., Kanehisa, M. (1991). Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* **11**, 95-110
- Narayanan, S., Surendranath, K., Bora, N., Surolia, A., Karande, A.A. (2005). Ribosome inactivating proteins and apoptosis. *FEBS Lett.* **579**, 1324-1331
- Nielsen, K.K., Bojsen, K., Roepstorff, P., Mikkelsen, J.D. (1994). A hydroxyproline-containing class IV chitinase of sugar beet is glycosylated with xylose. *Plant Mol. Biol.* **25**, 241-257
- Nielsen, K., Boston, R.S. (2001). Ribosome-inactivating proteins: A plant perspective. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 785-816

- Nilsson, T. (2000). Postharvest storage and handling of vegetables., In: Fruit and Vegetable Quality (an integrated view). Hrsg.: Shewfew, R. L. and Brückner, B., Technomic Publishing Inc.
- Nishikawa, F., Kato, M., Hyodo, H., Ikoma, Y., Sugiura, M., Yano, M. (2003). Ascorbate metabolism in harvested broccoli. *J. Exp. Bot.* **54**, 2439-2448
- Oltmanns, H. (2005). Funktionsanalyse der Linker-Histon Genfamilie aus *Arabidopsis thaliana* mit doppelsträngiger RNA und Expressionsanalyse gewebespezifischer Promotoren aus der Zuckerrübe. Dissertation. Technische Universität Braunschweig, Braunschweig
- Ow, D.W., Wood, K.V., DeLuca, M., Wet, J. R., de Helsinki, D., Rhowell, S.H. (1986). Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cell and transgenic plant. *Science* **234**, 856-859
- Park, S.-W., Vepachedu, R., Sharma, N., Vivanco, J.M. (2004). Ribosome-inactivating proteins in plant biology. *Planta* **219**, 1093-1096
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* **24**, 255-265
- Pedersen, A.G., Baldi, P., Chauvin, Y. and Brunak, S. (1999). The biology of eukaryotic promoter prediction - a review. *Comput. Chem.* **23**, 191-207
- Potenza, C., Aleman, L., Sengupta-Gopalan, C. (2004). Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **40**, 1-22
- Qi, X., Harn, C., Mu, H., Wasserman, B.P. (1996). Nucleotide sequences of three cDNAs encoding major intrinsic proteins from *Beta vulgaris* L. (accession nos. U60147, U60148, and U60149) (PGR96-074). *Plant Physiol.* **112**, 861
- Radke, M. (2004). Freeze & Squeeze Version 2.0. In: Laborjournal 04/2004, LJ-Verlag Herfort und Sailer, Merzhausen, Seite 74
- Rausch, T., Greiner, S. (2004). Plant protein inhibitors of invertases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1696**, 253-261
- Reilly, K., Gomez-Vasquez, R., Buschmann, H., Tohme, J., Beeching, J.R. (2004). Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Mol. Biol.* **56**, 625-641
- Reindl, A., Schöffl, F. (1998). Interaction between the *Arabidopsis thaliana* heat shock transcription factor HSF1 and the TATA binding protein TBP. *FEBS Lett.* **436**, 318-322
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* **16**, 1616-1626

- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K., Hedrich, R. (2002). AtKC1, a silent Arabidopsis potassium channel alpha-subunit modulates root hair K⁺ influx. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 4079-4084
- Riedle-Bauer, M. (2000). Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. J. Phytopath. 148, 297-302
- Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. Trends Biochem. Sci. 21, 327-335
- Roitsch, T., Gonzalez, M.C. (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. Trends Plant Sci. 9, 606-613
- Rombauts, S., Florquin, K., Lescot, M., Marchal, K., Rouze, P., van de Peer, Y. (2003). Computational approaches to identify promoters and cis-regulatory elements in plant genomes. Plant Physiol. 132, 1162-1176
- Rosenkranz, H., Vogel, R., Greiner, S., Rausch, T. (2001). In wounded sugar beet (*Beta vulgaris* L.) tap-root, hexose accumulation correlates with the induction of a vacuolar invertase isoform. J. Exp. Bot. 52, 2381-2385
- Rotthues, A. (2002). Isolierung neuer lagerungsexprimierter Gene der Zuckerrübe. Diplomarbeit. Technische Universität Braunschweig, Braunschweig
- Rounsley, S.D., Ditta, G.S., Yanofsky, M.F. (1995). Diverse roles for MADS box genes in Arabidopsis development. Plant Cell. 7, 1259-1269
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sakamoto, T., Kamiya, N., Ueguchi-Tanaka, M., Iwahori, S., Matsuoka, M. (2001). KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. Genes Dev. 15, 581-590
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467
- Sangster, T.A., Queitsch, C. (2005). The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. Curr. Opin. Plant Biol. 8, 86-92
- Schiweck, H. (1970). Vergleichende Lagerungsversuche zwischen gewaschenen und ungewaschenen Zuckerrüben. Zucker 23, 559-566
- Schmidt, K., Heberle, B., Kurrasch, J., Nehls, R., Stahl, D.J. (2004). Suppression of phenylalanine ammonia lyase expression in sugar beet by the fungal pathogen *Cercospora beticola* is mediated at the core promoter of the gene. Plant Mol. Biol. 55, 835-852
- Schulze-Lefert P. (2004). Plant immunity: the origami of receptor activation. Curr. Biol. 14:R22-4

- Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev. Cell* 8, 517-527
- Schweizer P., Christoffel A., Dudler R. (1999). Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. *Plant J.* 20, 541-552
- Shahmuradov, I.A., Gammernan, A.J., Hancock, J.M., Bramley, P.M., Solovyev, V.V. (2003). PlantProm: a database of plant promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 31, 114-117
- Sieber, H., Huber, L. (1992). Mathematische Formeln, Ernst Klett Schulbuchverlag GmbH, Stuttgart
- Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., Neer, E.J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 24, 181-185
- Snyder, F.W., Tolbert, N.E. (1966). Influence of nutrition and season on photosynthetic incorporation of $C^{14}O_2$ into sucrose and other soluble compounds of the sugar beet. *Bot. Gaz.* 127, 164-170
- Song, S.K., Choi, Y., Moon, Y.H., Kim, S.G., Choi, Y.D., Lee, J.S. (2000). Systemic induction of a *Phytolacca insularis* antiviral protein gene by mechanical wounding, jasmonic acid, and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 43, 439-450
- Stahl, D.J., Kloos, D.U., Hehl, R. (2004). A sugar beet chlorophyll a/b binding protein promoter void of G-box like elements confers strong and leaf specific reporter gene expression in transgenic sugar beet. *BMC Biotechnol.* 4:31
- Staton, J.M., Thomson, A.M., Leedman, P.J. (2000). Hormonal regulation of mRNA stability and RNA-protein interactions in the pituitary. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 17-34
- Steffens, N.O., Galuschka, C., Schindler, M., Bülow, L., Hehl, R. (2004). AthaMap, an online resource for in silico transcription factor binding sites in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nucleic Acids Res.* 32, D368-372
- Steffens, N.O., Galuschka, C., Schindler, M., Bülow, L., Hehl, R. (2005). AthaMap web tools for database-assisted identification of combinatorial *cis*-regulatory elements and the display of highly conserved transcription factor binding sites in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 33, W397-402
- Strasburger, E. (1999). Lehrbuch der Botanik. 34. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Sturm, A., Tang, G.Q. (1999). The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* 4, 401-407
- Tang, G.Q., Luscher, M., Sturm, A. (1999). Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell* 11, 177-189

- Thurau, T., Kifle, S., Jung, C., Cai, D. (2003). The promoter of the nematode resistance gene Hs1^{pro-1} activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 52, 643-660
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., Simon, P. (2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288, 129-138
- Tumer, N.E., Hwang, D., Bonness, M. (1997). C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3866-3871
- van Damme, E.J.M., Hao, Q., Chen, Y., Barre, A., Vandenbussche, F., Desmyster, S., Rougé, P., Peumans, W.J. (2001). Ribosome-inactivating proteins: A family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 20, 395-465
- van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N., Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291-299
- van der Poel, P.W. (1998). Sugar technology: beet and cane sugar manufacture. Bartens Verlag, Berlin
- van Helden, J., Hrsg. (2003). Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 31, 3593-3596
- van Loon, L.C., van Strien E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 85-97
- van Nocker, S., Ludwig, P., (2003). The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function. *BMC Genomics* 4:50
- Verelst, W., Asard, H. (2003). A phylogenetic study of Cytochrom b561 proteins. *Genome Biol.* 4:R38
- Vitale, A., Wu, R.J., Cheng, Z., Meagher, R.B. (2003). Multiple conserved 5' elements are required for high-level pollen expression of the *Arabidopsis* reproductive actin ACT1. *Plant Mol. Biol.* 52, 1135-1151
- Vukov, K., Hangyal, K. (1985). Sugar beet storage. *Sugar Technol. Rev.* 12, 143-265
- Welinder, K.G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 388-393
- Wilkie, G.S., Dickson, K.S., Gray, N.K. (2003). Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci.* 28, 182-188

- Wilton, S.D., Fletcher, S. (2005). RNA splicing manipulation: strategies to modify gene expression for a variety of therapeutic outcomes. *Curr. Gene. Ther.* 5, 467-483
- Wiltshire, J.J.J., Cobb, A.H. (2000). Bruising of sugar beet roots and consequential sugar loss: current understanding and research needs. *Ann. Appl. Biol.* 136, 159-166
- Wobus, U., Weber, H. (1999). Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol. Chem.* 380, 937-944
- Wyse, R. (1974). Enzymes involved in the postharvest degradation of sucrose in *Beta vulgaris* L. root tissue. *Plant Physiol.* 53, 507-508
- Wyse, R.E. (1978). Effect of low and fluctuating temperatures on the storage life of sugarbeets. *J. Am. Soc. Sugar Beet Technol.* 20, 33-42
- Wyse, R.E., Peterson, C.L. (1979). Effect of injury on respiration rates of sugarbeet roots. *J. Am. Soc. Sugar Beet Technol.* 20, 269-280
- Wyse, R.E. (1980). Injury and mold growth as determinants of storage life. Proceedings of the 43rd IIRB (International Institute for Beet Research) Congress, Brussels, 5-19
- Yang, H., Matsubayashi, Y., Hanai, H., Sakagami, Y. (2000). Phytosulfokine- α , a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions, precursor and receptors. *Plant Cell. Physiol.* 41, 825-830
- Yang, H., Matsubayashi, Y., Nakamura, K., Sakagami, Y. (2001). Diversity of Arabidopsis genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor. *Plant Physiol.* 127, 842-851
- Yoshida, K., Kaathien, P., Matsui, T., Kawaoka, A. (2003). Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 665-670
- Yoshida, S. (2003). Molecular regulation of leaf senescence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 79-84
- Yun, B.W., Huh, G.H., Lee, H.S., Kwon, S.Y., Jo, J.K., Kim, J.S., Cho, K.Y., Kwak, S.S. (2000). Differential resistance to methyl viologen in transgenic tobacco plants that express sweet potato peroxidases. *J. Plant Physiol.* 156, 504-509
- Zar, J.H. (1984). Biostatistical Analysis 2nd Edition. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, N.J.
- Zardoya, R., Villalba, S. (2001). A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 52, 391-404
- Zhang Z., Collinge D.B., Thordal-Christensen H. (1995). Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J.* 8, 139-145

7 Anhang

7.1 Nukleotidsequenzen von vier Nach-Ernte induzierbaren Promotoren

Nukleotidsequenz des 2836bp langen Promotorfragments von *BvHSP83*:

XhoI

```

1  CTC GAG AAA GCC ATC TAA AAG GAG TAG GAG AGA GAG AGG AAG GCA TTG ACG AGT TGA GAA
61 CTG AGT TGG ATC GTT CGG ATT TCT TCT TCT TCC TGA GCG TAC TTT TAA CAC CCG CCA TTA
121 CTC GTT AGC AAT GAA GAA GAG AAG TAG CAC GAG TTT CTT ACA TCT TGA AAG AGA GTC AAT
181 GGT TTT GGT TGG TGC GTT ACG AAC GAG ATG GGA TGG GAC TAT GGT CTA TGG GAG AAT GGT
241 CAA CTA GAC CCA AAT GCT AAT GCG ATG GAT TAG GTT ATT TAG GTC CCG TTC TTT TTC ACT
301 AAG ATA AAA TGA ACT GAA ATA AAT TGA ACT AAT AGA AAC TAT ATT ATA GAG AGA TAT TAA
361 ACT AAA TTG AAC TGA AAT TAA CTG GCT GAA AAT AAA TCC AAA ATA ACA GAG CCT TAA CCT
421 TAG TGG TGA AGT GGC GGA ATG AAG ATT TTT GTA TTA AGG TCT AAC TCA GAC AGT TAG AGC
481 TTC CGT CAC GTA ATC AAG AGA CTG GAC CAA TGA TAA TCA AAC GTC TCG CGC CAT TGC TCT
541 TGA ACA AGA TTT CAC ACA TGT GAA GAT AGC GGA TTT TCG AAA CAC ATC GGC ATA TTG CCA
601 AGG CCT TAA AAC CCT CTC TGA TTA GTT AAA TAG TGT GAG GGA CGG TGT GGC GGT GTC TGG
661 TAG TCG CCT TCT CCT ACA CAT GGT GGT TGG GTT TAC CGA GGC CTA CAA GGG TGT TGG CAC
721 CAT GAT TCG GCA AAG TAA ACC TTT GCC TTC CTT CAT TAA AGC ACG TTC GAG CCT TCT CCC
781 TAA AGG AAA TGT CAA TGC TTG ATG AAT CAC CGT TGG CTA TGG TGG TGA CTC AGA ACG AGG
841 ATG GCG CAT CTG ACT CCT TTT CTC ATA CTC GAC ATG GTA AGA AAG TAT GGA ACC ATG GCT
901 CGC ACA ATA ATC ATA AGC AAT CTG GTG GTG GTC GCA GCG ATG GAA AGT GTC GTG GTG GTG
961 GTG GTC GTG TCC GCG GTG GTC ACG GTG GAG GCG CCG GAC AAC AAC AAC CTT AGG CCG CCA
1021 CCC CTC CTT GGT CGT ATG CAG CTG GTA GTT GGT GTT GGG TGC CCC AAC AGT GGG TAG TTC
1081 CTT TTT ACC CAC ACT CAA CAG TGG GCA GTT CCG TTA TTG GGC CAT ATC CAA ATA GTC TAG
1141 TAA GTC AAC GAG GTT TGA GTA TGC CGG GCG GCT GGG CCT GCG TGC ATC TCA AGT CTA TAT
1201 GGT TGC ATA TGT TCC TAC TGA TCT TAC TTT TGC ATT TCA CAC TAT GAC ACT TGC TTC TCC
1261 GAA CTC CAA TTG GTA TAT GGA CAT TGG TGC TAC CTC ACA TAT GAC CTC CAC ACC AAG TAA
1321 TCT CAC GTC TTA TTT TAA TTT GAG CAA TAC AAA TGG TAT TAC TAT TTG TAA TGG TCT AAC
1381 AAT TCC GAT TTG TGG TTA TGG TAA AAA AAT TCC GAT TTT TGT GGT TAT GGT CAT TCA CAT
1441 ATA TCT TCT TTC ACA AAC CAA ACA GAG GAA AGT GAA GAA AAT AAT TTT ACT CAA AAA TAT
1501 TTT CCT TCC AAT CCG TCA AAA AGA ATC TCG TGA TTC CTT AAC AAA AAA AAA AAA ATT AAA
1561 AAA AAA ACA AAG GGA AAA ATA GTG TAT TGT AGG GCA TAC GTA GAA TAA TAC GGT TGA CTA
1621 GAG ATG GCA ATG GAT CAT GCA ACC GAC CCA TTT ATA TGG GTC TGA GTC TAG ATA TTT TAG
1681 ACC CAA TGG GTC CGG GTC GGG TCT GGG TCC ACA TAT GTT AGG CAC CGG CTT GAT TCG CAG
1741 ACC TAT TTA CAT ATT AGA ATT TTT TTT ACC TAT ACT CTA AAG TTT TAT TAG TTG TGA TTT
1801 TAT TAA CTC GTT AGT GTT GTA ACT CCA TAT AAG ACT TGT AAC TTT GTC AAT TGT AAC ATT
1861 TTA TGA TTT CAT GAG TTA ATT TTT AAA ATT TTG TTT AGA TAA TAC TTA AAC CAG GGA TGC
1921 AAG ACC TAT ATA GTA GGG CAG AAT TTT TTA ATT ACA TAT ATT CAA AAA TGT AAT GAA AAC
1981 TTA GAA TTA TGA TGG ACA CAT TTA GGA CCC AAA TAG GAC CCG TGG ATC CGC TAG ATT CAC
2041 CGA ATC TGG AAC TGG GTC TGA AAA ATT TTG ACC CAA CGA ATT TAA AAT GGA TAT GAA TCT
2101 GTA AAA AAA TAA ACG GGC ATG GGT TCA GTT GAA CTC GCC GCA GAC CCT CCC CAT TCT ACG
2161 TTG ACG GTC ACG GAT GGT GCA TGA AAG GGG TCA ACG ATC AAT GTG AGA GCA ACC CAA GCG
2221 TTT GGT TTC CCA ATT TCC ACT ATT TTC GCA AAT CAT TTC ACT GTA AAC ATT TAA GAA AAA
2281 ACG GTG AAC ATT CCA GAC TCA ACT AGA CAA CTA GTT GGC TTG AAC CTT CTC GAA TTA TTT
2341 TCT TAA CAA AAA GAA AGT TCA TCC TCA AAC GCA CAG TTT CAT ATC CAT AAC GCC ACA ACA
2401 CAC AAA AAA CGC GTC GTT TCC TCA CAA CAA TTT TTA AAA AAC CCC ACC AAA AAT AAT ACT
2461 AGT ATA ACA CAA CTA AGA AAC AAT TCT AGA GAA GAG TAG AAC TCT CCA GAA CAA AGA AGC
2521 AAG AAA ATA GCT CTC CTC TCT GCT ATA AAA ACC TCT TCC TGT CTT TCT CGC CTT CAT CAC
2581 CAT TCT CTC TCT AAA GCA ATC TAA GCA AAC ACC AAA GCA ATC AAT CCA CAT TAT CTC TTC
2641 TAT AAT CGC GAA ATT TCT AGG TTA TTT TTT TCT GAA GGT GCA TCA ATG GCG GAC GTA ACA
2701 ATG GGT GAA GCT GAG ACC TTC GCA TTT CAG GCA GAA ATC AAT CAA CTT CTG AGT CTC ATC

```

2761 ATA AAT ACT TTC TAC TCT AAC AAA GAG ATT TTT CTT CGT GAA ATC ATT TCT AAC TCT TCA
 2821 GAT GTA TGT CGA ATT C
EcoRI

Nukleotidsequenz des 4496bp langen Promotorfragments von *BvCPRX1*:

BcuI

1 ACT AGT ATA TTG GGG TTG AGG AGA CAA CCA TTA ACA AAC GAA TTC AAA ATT TTA ATT CTT
 61 CTT ATA TTT ATA TAT GTA TTT CTG TTT CAT CTT CAT TTC TTT TTT TGC ACA ATC CTA TTA
 121 AAA TCT CAT ATT CAA TGA AAT TCG GCT AAT TCA ATC AAG AGA TAT TCA ACA CTA TGT TCA
 181 ATT CCT CCT CAA TGT ATG CAC CCA ACT CCA AGC GAT CCA ACT AAT AAG GTC TGT TCG TAA
 241 TCA TTT TTT GTT TTC AAT TTT CTG TTT TTC TGA AAA CTA AAA ACA AAA AAC AGA ATA CTA
 301 GAA AAA GTG ATT TTC AAT CAC ATT TTA GTT ATC AGT TTT CAG AAT CAT CAT GTT TTC AAT
 361 AAG TTC CAT TAT TTT TTG GTT CAT TAT AGG ACA TAT AGT AAT ATT ATA TGA CTT CTA AAA
 421 ACA AAA AAC TGA AAA CCA CAG TGA TAA CGA CCG GGC CCT AAG TTA CGA GTT TAC AAT AGG
 481 CAA CAA CGC AAC ATT AAT TAG AAT TCA CCC GGT TAT ATC ATA TAC CCG CGT GCT GCA GGT
 541 GGC TTA CAC TTA TAT ATG ATA TAG CCG TTC GAG GGC ACC TTA AGG CTC ACC CTC CTT TCG
 601 AAG ACT TCA TGC ATG CGC ATT CAG GAA TCC ATC GCA CCA TCA AGG CTC ATC GAA CAC CAG
 661 GGG CAG ATG TAC ATT GTA CTG TGC TTA GTG CGG TTA GTT GAC CTC ACT TAA ATT TGA AAA
 721 CTT CGG GAA CTT TTC TTA CAT AAT TTG AGA TTT TTT TGG ATA TTT TCT AGT AAA ATT GAT
 781 TGT TTG AAC CTA CTA AAA AAT AGT AAT TTT ATT TCG ACC TCA CTG AAT ACA TAT TCT AGA
 841 TCC ATC AAT GAA CAA AAA CGC CAC GCA TCG AGT CAG AGG AAG GAT CTG CTG CTA TAG TGT
 901 TAT TGT CTC TTG CTC GCT AGA ACA TTG TCC ACA TAA AAA GCA TCG TCG ACG TCC ATC ACA
 961 TGC ATG CTG CTC ATG GAG CCT ACC TAA TTG TTG CGG ATG CTA CTC AGC CCT CCA TAG GAA
 1021 GTG GCT TAG TTG AAG GGG GAC CTA GGT CAT GAA CTA CGT TAT TAT CAG TTC ACG TGC TAG
 1081 TAC TTG AGA TAA TGC TAC ATG GAC ATA AGT CCA TAA CAC ATG ATA AAT CAA TCG TAC GTG
 1141 AAA GGG TGG CGG CTA CCT TTT TCT AAT TGT ATT TGT GTC ACT ACT TTT TCT CTT CTG CTC
 1201 ATC ATC ATA TCG TAA GTC AAA AAT TCG TGA TGA CTA ATG TAC GTC TAG TCA TGC AAG TTT
 1261 ATT AAT TAG GAA AAA TTA TTT TTG ATA AGA TAA CTT TTG CGC GTT TTT CTT AAA TTA AGT
 1321 TAA TTT TTT GAT TAA ATA TGA ATA AAT TAA TTT TAT ATC TAC TTT TGT TAT AAA TGA GTT
 1381 AAA TCA CAA TGT CAT CCT ATT AAA ATG TGA CAC GTA TCA TAC TTT CAA TGT TAT GAA GTA
 1441 GAT ACA AAG TTA ACT TAT TAA TCA GAA GAT TAC CTT ATT AAA AAC AAT TTT TCT TAT TAA
 1501 CTG TGA ACG TTA TTA TTA ATA CAT AAT AGT AAA CAT TAT TAT CAT GTG AAA TCG TAT TAA
 1561 ATT TAT TTC AAT TAG ATT TAA GTT AAT AAC TTT AAT TTA TAT AAT TTT ATT AAT AAA AAT
 1621 TAA AGA TAT ATA TTA ACA GTC AAA TAA ACG TAT TAA AAA CCA TTA AAA AAA AGA TAA ACT
 1681 AAT AGA ATC TCC AAG GTG GTA AAG TCT AAC CAA CGA CGA ATA AAC AAT TCC ATT ATA CTA
 1741 GCA CGA TAG ATA AGG TTA AGT TAC CAT ACT TAT TCA TGT GAT GTG AGT GAC ATG TGA CTA
 1801 AAG TTA CCA TGT TGG CAC ACC ATG CTA CGT AGA TTT AGA AAA GTC ATA CAC CCG ACA ATC
 1861 AAC TTT AAT TTG GTT GCA TGA TTA AAA CGA CGC CAT TAG AAA AAA AAT CTA AGC AAC ATA
 1921 TAG TCA TAT ACC TCC AAA CTT TGC ATT GAT TGG GTT CAC TAT AAA TAA AGA AAA GCC TCT
 1981 CAC TCA TAA ATT TCA TCA AAT CTT GCT TGA AAA TAA ATC CAT TAA CCT AAT TGA GAT TCT
 2041 TAT AGC AAG TTT TGC ATA TAT AGA ATA TGA GAG AAA CCT CAT TTT CCT TTG TTC TTT TTC
 2101 TTG GGC TTG TTT TAA TAA CAC TTG TTG GCC ATT GTT ATG GAC AAC TCA AAG TAG GGT TTT
 2161 ACG AAG GTA AAT GTG GGA AAA ATG ACG TCG AAA AAG TCA TTC ATG AAG TGG TGA AGA AGA
 2221 AGA TTA CGA AAG ACC CAG ATA CCG TGT CTG ATC TTG TTC GTC TAT CAT TCC ATG ATT GTT
 2281 TTG TCA GGG TAC ATA CTT CAA TTA TAC TTT TAA CTG ATG CTT TCT CGG TTT CTT TTT AGT
 2341 TTA CTC GCT TCA CAT TAG GAT GAA CTA AGA ATG AAA TAC AAA AGT ATG GAA GAG AAC CTG
 2401 ACA CGC ACG TGA AAT ATA GAA ACT AAA CAA GAC ATG TTA CCA AAA GAA TAC AAA AAA CAA
 2461 GAG TGT GCA GGT TAA AAA GAC ACA TTC CAA AGA GGA AAG TGT GTA GAG TAA AAA GAA ACG
 2521 AAG AGA GTA CAA CAT TTT GCG TTT TAG TAA TTA ATC ATC TTT TAG AAT AGT TTA CTA TTG
 2581 TTG TGA TTA ATG TTA AAC TAA TTA TTA CAT ATA TAC TAA ATG GTT TGA TTC AAT CTT AAA
 2641 GGG TTG TGA TGG ATC AAT ATT ACT CGA TGG AGC TAA TAC AGA GCA AAA AGC ACC AAT AAA
 2701 TCT AGC ACT TGG AGG CTT TGA AGT TGT TAA GGA TAT TAA GGA AGC TAT TGA AAA AGC ATG

2761 CCC AGG AGT TGT ATC TTG TAC TGA TGT TAT TGT AAT AGG TGC TAG ATC TGC AAT ATC CTT
2821 GGT AAG TTT ATA TAT TTG TAA CTA CTT CCT TCG TTT CAA TTT AAT GGT GAC ACT TTC TAT
2881 TTT AGC AAG TTT CAA TTT AGT TGT GAC AGT TTC ATT TTG AGT AAT AGC TTC TCT CCA TCT
2941 CTC TTC TGT CAC ATG GGA TCC TTT TAT TTT CTT TCT CTA TCT CTC TCT TTT CCA AAA TTG
3001 CTT AGA AAT TCG TGA TTT TAA AAG TGT CAC GAC TAA ATT GAA AAG GAG GAA ATA GTA CAA
3061 AGT TTC TTT TAT ATG TTT GAT TTT GAT CTT TTT GTC AAC TTC CAT ATA CTT GGT TGT TAT
3121 ACA TGC AGG CAG GAG GAA AAT GGT TCG AGG TAG AAA CTG GAA GAA GAG ATG GAG TTG TGT
3181 CAC TAA AAA GTG AAG CAC AAG CAA ACA TCC CTC CAC CAA CAA TGC CGG TTT CTC AAG CAA
3241 TTC AAT TGT TTG CCA AGA AAG GGC TCA ACA AGG ATG ATT TTG TTG TTC TTT TAG GTA TTT
3301 ACT AAA TAA GAA AAT GCG TCC GCT AGC ATA CTA GGG TAT TAC GAT ACA CAT ATA AAT TGT
3361 GTT TTA TCA TGA CCG GGC TAA GTT TCA AGC TAA TAA AAA GCA CTC CGA GCT TAG GAG TCG
3421 TTG GAC TTT GAT AGA GTA TAA AAC AAT TCA TGA AAC TCC AAC CAT CAA CTT AAA CTT TTG
3481 ATT GAG TTG GTT CTT TGA CAA ACT TGG TTG GTC TTT TGC TCC TAA AAG TAG AAA AAT GCC
3541 AAA AAA AAA ATG GCA CTT AAT ATC TAG CTT TTA AAG TAA AAA TCA GGA AAA ACC TAA AAT
3601 GAT TGA CTC TAA AAA TAA CCA GAA TAC TCA CAT GAT CTT TAA TGG GTA TTA GTA TTA CTC
3661 CCG TAA CCT TAT AAT TTA GTA AAA GTG TGT TCT AAA CAA GTG ATA ATT TTG ACC TAA TAG
3721 AAT TAC TTA ACT TTA TTG GTA CTT ACT ACA ATA TAA AAT AAT TGC AAT TAT ACG TCA TTT
3781 CTT AAA AAG TCA ATA ACA GTT GAA CAA AAC ACT TCT AGT CTC CGT TTG GTA GTA CGT AAA
3841 ACA TGT TCA GTG TAA AAT GAT TTT CAT GGA AAA CAA TTT ACC ATG AAA AAC ACA ATT TCA
3901 AAA TTA GTT TTT CAT TGT TTG GTT TCA TGT AAG AAA AAT GAT GAA ATG AAA GAA AAA ATG
3961 AAA AGG AAA GTA AGG AGG TAT AGT AGT GAC AGG AGT GTA TAA GAG AGA TAC GAA AAA CAG
4021 TTA ATT TCC TTC ATT TTG AAG GAA AAA TGA TTT TAC ACT CAT TAA TCA TTA ACC AAC CAA
4081 ACT ATG TAA AAC TGA AAA TAG AGA AAA ATA GTT TTC CAA AAA AAG TTT AAC GCC TAT CAA
4141 ACG GAG CCT TAA TAT GAA CCG CGA AAA AAC TTT ATT TGT TCA CTT AAC TAA TAA TTT CAT
4201 TGA TTC TTT GCA GGT GGA CAT ACT GTT GGA ACT TCA AAA TGT CAC TCA TTC AAA GAA CGT
4261 CTA TAT AAT TTC CGC AAC ACC AAA AAA CCA GAC CCA ACT ATT AGT TCA TCT TTA CTT CCA
4321 CTA TTA AAA AAG ACA TGT CCT CTT AAC AGC AAA ATT GAC AAT GAA ACA TTC CTT GAT CAA
4381 ACT CCA AAC AGC CAT TTC AAG ATT GAC AAT GCC TAC TAC AAG CAA ATT CTT GCA CAT AAT
4441 GGC GTT TTG GAG ATA GAT TCG AAC CTA GCG TCG AAT CCA GGA ACT AGA GGA CTA GT

BcuI

Nukleotidsequenz des 6553bp langen Promotorfragments von *BvRIP-r1*:

BamHI

1 GGA TCC ACA TGA TGA TGC TTC TGG TAA TTT ATA GTC CAA CTA GTC AGT TTA TTT ATT TAG

61 AAT CTT TGT CCT ATC TTT CCG TCA TTT ACC CCT CTT TTT TTT TCT TTT CTT TTA GGG

121 TCT CTT TCG AAA ATT TCA TGC CTA TGC TCG GCT CTC ATA CAA CGT CAC TCA TCT AGA GGC

181 CCA ACA AGT CCC AAC CTC CCC CTC CAA TAT TGA AAT TTG CTT TCA CCA AGA TTT GAA CTT

241 CGA TCT CCA ATG AAA GAG ATA AAA AAT CAT ATC ATT GAA CTT AAG GAT TCT TGG TGT CCA

301 TCA TTT GCA TCT TAG CTT CAA TGC TTT GAT TAT TAT ACT ATT TAC GGT TTT TTC ACC AGA

361 TCC CTC CAA CAA ATC AAT AAA TTC ACC ATA TAC CCT CAA TGT TTC AGA AAT GCA CCG TAT

421 ACC CTT GAG TTT CGA AAA CTA TGC ACC AGA TCC CCT TTT CCT AAC TGG CAT TAA CCC ACC

481 GTT AGA TTA TTT ACG ATT TTA CCA TCA TTA AGC CCT AAT CCT AAT TTA ACC TAA CCC TAA

541 TCC TAC CCC TAA ACC CTT CCC CTT ACC CTA ACC CTA CCC CTT GGC AGC CCC CAC ACC ACC

601 CCT CCC CTC CAC CCC ACC CCA GCC CCT ACC CTC CCC CTC CCC CTC CCC CAC CGC TGA TGT

661 CCG TGC CAG CCT CCC CCA CCC CCA TTG TCG CTG CTT TTG CCG GTC TCC CCC ACC CCA TCG

721 ACG TTG CGC ATG CTG GCC TCC CCA CCT CCT GCG CGT CTG TTC ACC GCT GAC GAC TCC TCA

781 CCC CTT CCC TTC GAA CAC CAA ACC CAT ACC CCT CCC CTT CGA ACA CCG GCT AAC ATC GGC

841 TAC CTT CGA ATA CCC CAC CCA TCC CCC TTC GAA CAC CGG CTA ATT TCG AAC ACC AAA CCT

901 CCC CCA CAC CAC CGG TCT CCC CCA CCC CTC CCA CAC CCT TGA ATT TCA TCA GTT TAA ACT

961 TCT ACA TAT TCT AGA TTT TTT AAA AAT TCC TTC AAG TTT AGA AAA ACA ATA ATA GAA CAG

1021 AGT TAA TTA GTA AAA TTA AGA AAT TTT TGG TTC CTT AAT ATA AAA TGT ACA ACC ACG AAG

1081 AGA CCA TCC CTA TTC CGC ATC AAT ATG GAA GAG CCA TGT AGC CGT TAA AAA TAT TTG CTT

1141 TAT TTG TTG TTT AGA GAG CAA AGT GTA TTA TAT TTA ACC CTA AAC TTT ACG GCC ACT AAT

1201 GGA TAT TCC CTC TAC GCC GTA TTA TTT TAT ACG TAA TTA CGT ATG CAC TGT TAT ATA ACC

1261 TAC CTT GAC CAT ATT TGT CTC GTA ACA TAT AAA GAT ATA TGT TAG GTA TAA GAT ACC AAG

1321 GAT CTT TGG TCC AGT AGT ATG GCT TCC TAT CTT CGA CAT GGG AGA CCA AAG TTC GAA TCT

1381 TGG TTG AAG CAA AAT TTC AAT ATT GTT GGA GAG GAG GGG GGG GGG GTT GGG CTT GTT GGG

1441 CCT CTG GGT GAG TGA GTG GCC CTG TGT GAG GGC AGC CCA AAG AAA ATT CAT CTT ACC ACG

1501 GGT TCT CGA AAG GAG TCC AAA AAG ACA ATA TAT ATA TTA GGT ATA AGA TAT TGT TGG ATT

1561 TGT GGT AAT GTA TAC ATA TCA AAA TAT CAA CAT TCT ATA ACT TTT AAT AAT CCA CTA GTA

1621 TTG CTG CGG TGA TTT TGT TGC GAT TTT ACC CAT AAA CAG CAA TAT ATC ACG TAA AAA GAA

1681 AAG GAA AAA ATG TAA AAT AAG CAG CAA TAT GGT TTC AAG AAA ATT TTT TTT GAA AAA TTT

1741 TAA CTG TTT GAC AAA ACA TAT TGA TGC GGT TTC TAA GAA AGA ACC GCA TCA ATA TAT TAA

1801 AAT AAT ATC AAA CAA TAT TCT TTG AAC ATA TTG TTG CAA TTC GTA CAA AAT ATC GCA GCA

1861 ATA ATA GGC TTT TAA AGG GTC CAT CTA GGG TTT TCT TGT TAA GTT AGT GGA TGG GTG TCG

1921 TTT AAT TCT CTC ATT TAC TCG GCT AGG GTT TCA CTC CTC TCA CTC TCT CTC CTC CTC TCA

1981 TCA GTT TTA CGC CTC ATC TTC TCT CTT TCT CTC TTT GTA TCA TCA GTT TCA CGC CTC ATC

2041 TTC TCT TAA TCA CGA CGC AAT GCT TTA ACC ACC ATG TAC TGC TAA CTC GAA ACC AGG TCA

2101 TCG CTT CAA TTG ACT ACA CCG TTT CTT CTC CCT CTC TTT TGT CCT CAC CAT GAC GAA GCA

2161 ACA CGC TCC ATC TTC GTT CAA CGA GAA ACG CGC TAA CAT CCC ATA GCG AAG AAA ATA CCT

2221 GAA GAT GAA TTC GGT CTC CGA TGA GTT TGG CGG GTT ATC TTT GTT TAT CAA TTT TTT TTT

2281 TTT GTT TTT TAG ATC TGT TTC TTA ATT TTT TTC GTT ATC ATA GCG GTG GTC TGT AGT CAT

2341 GAT GTT TGT ATA TCT CTT TTC TTT TCT TTT TTT TGG GGG GTG AAG GCA GTC TGT TTT TTT

2401 TTA GGT TAG TGT TAT AGG TAG ATC TAT TAG TCA AAT TTT GTT ATA AAT TCT GTA AGA ATA

2461 TGG TTC TAT AAA ATA TAT GAG TGT AAT GAT GTA AGT TTG TGT TTT AGT TAA GTG TTT TAT

2521 TTG ACA CTA TCT CTT ATC GTA TAT GAA TAT ATA TCA AAA AAC AAA TTT CTT TTT GAG TTG

2581 TAG TAC ATA TAG CTG CAG TTT TTG GTA AAA ACC GCA GCA ATA AGC TCT AAA TAT TTT TAA

2641 TAA AAA ATA AAC CTA TTG CTG CGG TTT TGG ATA GGA ACC GCA GCA ATA GCT CGG CTT ATT

2701 GCT GTG GTC AGA AAC CAT GAC AAT ATG CTA ATT ACC TAT TGT TGC ATC CTT AAT TGC TAC

2761 GCG GCC AAA ATT GCA GCA ATA TGC CAC TTA ATG ACC GCA ACA ATA AAC AAT TAT TCT ACT

2821 AGT GAT CGA TAA TAA ATT ATA CTA TAG GTC AAA GTT GTG CAT ATT GAC ATG TGT TAA GTC

2881 AAA CTG TAT CGA TTA ATA TGG GAA GAA GGA AGT ATG TAA GAA AAT AGC ATC ATG TGG GAT

2941 CTT ATA ATA TTC GTA TCA ATA TGT ATT TGC AAA ATA TTA ACT TTT CAC AAA ATG TTT TGA

3001 AAG GAT AGA GTC TAA TAA TCA AAG TAA TAG GTC TAT TAA AGT CAT AAA TAC CCC TAA AAA
3061 AAT CAT AAA TAC AGA TAA TGG AGC AAA AAT TTT GGG AGA GAT TAA AAA TTA AAA GTA ATT
3121 AGG AAA GCC ATT TCC ATA AGG TTA CTT GTC TTT TCA GAG TTG CAC CTA TTT TTA CTC CAC
3181 TGC AAT GGA ATA ATA CTA GAA GCA ACA TAT ATA ATG TAA TTG GAT ATT CTT ACA TTA ATC
3241 AAC TAA ATA AAA GGC CTA TAT AGT CTC CAA CTA GTT GGA CAA TGA GAT GTT AAA AAA AAA
3301 AAA AAA AAA AAT TAG TTG GAC AAT GGC ATA TGT TAT ATG TTA GCT ATA TGT CCA ATA AGG
3361 CGA CTG AAA GAC AAC CTT TAC CAA ATT GAT AAT AAT AAA ACC ATC ATC GTC AAC CTT CTT
3421 ATC CTT ATG TGC CTG AAT AAT GAG AAC CTA GAC ATT ACC GAA CGG CTA ACA ACA AGA TTT
3481 TTA CCC CTA ATT AAG TCA TAA CTA GCG CAT TAT ATA TCC TTT AAG TTT GTC ATT CTG TGA
3541 TTT CAT TTA ATT TTC TGT AGT CCC TTG CCA AGT CTG CCT ATA TAT ATA TAG AAG ATG GTG
3601 TAT TGT AAC TTG TGA CAC TAA ATT TTC AAG CAT CCT CCT AGT TTC CAC TTT CTC CTT CAT
3661 CCA CTC AAC GCC TTA GCT ACG TAA GTT ACC AAT TAT GCA TTC TCC ATC ATA CGC TAA TTT
3721 ACA TTA TTG TTA ATG CTT CCT TAC ATA TTG TTT GAT TTA AAC TAT TTT GTC TTA TCA AAA
3781 TTT ATC TGA TCT GGT CTT ATT AGA ACT TAT CTT ATC TTA TAT GAA TTT AAC TTA TAT TAT
3841 CTT ATC TGA ACT TAT ATC CTA GTT TAT TGT GTT ATC TAA CAT ATA TAG TTA TTC CGT TTT
3901 ATT CAA CTT ATT CTA TCG TAT ATC TGA TAT AAT CTT ATC TTA TCA TAA CTT GTT TTT GTT
3961 AAA TAA GTG AAA ATA AGT TCA ACA TAA CAT ATA ATC TCA GTC ATT CAA TCT GTT TTA CAC
4021 TGT TCT TTC ACA TTT AGT TGG GAA TTT TTT TAA TTT TTA GCA TTA TTA TTT TCG TAG ACC
4081 TGA ACT TTT CTT TAT CTA TAT CTC TTT TTA TTC CCT TTT TGT TGG TAA TTT ACA AAT TCT
4141 AGA ATA AGA CTG GTG CAC AAC AAA GTA TCG TAA GTT GGG GGA AAT TTA GCA GTT ATA GAA
4201 GTG ATT ACT TAC GGT TAA AAC TCA CCT ATT TTT TTT TCT AAA AGC GAC TTC TTT TTT ACT
4261 TAC AAA ATT ACC CCT ATA AAC TTA AAA AGT GAT ATT TTT AGT CTA AAA GTA AAA GAG TCT
4321 TAC CAT AAA TTA TTG TGT ACT CGA TGC TCT CAA GAT TTT CTA TTG TTT ATA TTA GGA ATA
4381 TCT TTG CAG CCC TCT CGT TAG TAA AGC TTA TTC GAA ATT ATT ACT ATT ATT CAT GTC CTT
4441 GCT TTA GCT AAA AAA CGT CAT CTT TTC GTT AAA GTT GCA ATT TTC TTA ATC CAA TTA TAA
4501 TTT ACA TGG TTA ACA ATT TCA TAA CAA ATT ACT TAC TAT TTA ACA CTT CCT CCA TTT CTT
4561 TTA ATT ACA ATG CTT TCA CTT TTG CAT ACT ATT TAT TTT ACA CCT CCT CCA TCT CTT TTA
4621 GTT GCT ATA CGC TTT CAC TTT TGC ATA CTG TTT ATA TAT AAA TTC CAA AAA GAT TTA TTA
4681 CTA ACT TAT GCA AAT AAA TAT CAT TAT GCA AGA TGT TTA GTT CTC AAT GTA CAC TGG TGA
4741 ACA TGG ACA AAA CAT TAG GGA ACC AAG AAT TGA ACC CCC AAT AGA TTA AAA AAT GAA TAT
4801 TTA CCA TTC ATT ATT TAT TTT TTT GTT CTT TGT AGT CCG TTT TTC TAA AAA TTA AAA ACA
4861 AAA TAT GCA AAT CGC AAA AAA CAT CTT TCA CTT TTC AGT TGC CAA ATT TCA AAA TAA ACA
4921 TGA TTA GTT TAA GTT TAA AAC CTT AGT TTC ATG ATA CAG CTA TTA TCA TAT GAC TGT AAA
4981 AGT CTT AAT TAA ACC GAA AGG TTG GAA TTT ATA GCG TGA TAC CCA ACT GTC CCT TTA CTT
5041 CTA AGA GAC GAC TTT TAT ATG TAA AAG TAT ATG GGC CCG GAC GAT GCT CCG GGT TTT CTC
5101 TAT GCT ACA ATT TAG TAG TAG TTA AAT AAG TCA TCT CAT TTT CAT TTG AAA AAG TTA TCT
5161 TAT TCA TTA TAT AGA TTT TAA AAG TTT TCC ATT CAT ATA TCA TTA TTA ATT TTG ATT GAA
5221 AAA ACA ATA ATG GTA TGG TGG AGT AAT GGT TGG ATC TCT TTA TTT TAT ACT TGA GGT TGT
5281 GGG TTC GAA TTT TCA CGT CAA CAA TTC TTT ATT TTT ACT ATA TGA GAA AGA CGT AGA TAA
5341 AAT GTT ATT GAA TGA GGG ATG GTG ACA CGA GGC ACA TAT ACG TTC TTA GGA ACG CCT TTT
5401 AAT ATA TTA GTA TAG ATT TAA AAC AAC ATA CCT TTA ATA TAA GCC AAA ATA TAA TTG GAG
5461 GTT TGA GAC TTT ACT TGC CCC AGC TAA AAT TCT CCT ATG TTG CTG AAC ATC AAA ATA TTT
5521 TTT TTG ATC CAT ATG AGC CTA CAA AGT ACA AAG AAG GGG AGG GGG GAT TTG AAC CTG TGA
5581 CCT ATC GTT CAC ATC ACC TCA ATC TTA ACC ACT AGG CCA AGA CAT CCT TGG TTA CTG AAC
5641 ATC AAA ATA TAA TTG GAG GGT AAT TGT TAC TAT CTA ATA GAT TAT TAA ATA TAT TAA AGA
5701 TCA AAA ATT ATA CAT TCG AAA GCA TGA AAG TTA AAC ACG TAA CAA ACG AAT TAA GTA TAC
5761 GCT GTA TTA TTT TCA TAT TTT ATG CTA TGA TAC AGA TGC ATT AGT GTG ACA AGA AAA ATA
5821 TGA AGG CAT TGA CAG CAG CAA GAT GGA TTC AGT GGT GCA TTA TAA TGG TAG TGG TGA TTG
5881 TAC CAA TAA CAG CAA CAA CAA CCG AAG ATG AGG CAG TTG GCA AGA AAC TAA GCT ACA CCA
5941 CCG TAA CAT TCG AAC TAA AAT ACG GTG TTG AGC CAT TAA AAG GAT ACT CAA GTT TCT TAA
6001 CAA GAC TCC GCA ATG CAG TGG AAG CCC CCA CCA GGG CTT GCG GCT TAC AAT TTA CGC GAA
6061 AAG TTC CAT TAA CAG GCA AAC AAT ATG TTT TAG TAG ACC TCA AGT TTA GCA ACA CAC AAT

6121 GGG TGA CTT TAG GAA TTG ACG CCA AAG ATT TAT ATG TGT GGG CTT ACC AAG ACA ATG TAA
6181 AAT ACA ATG GTA AAT TTC GGG CTA ATT TCC TAG GTG ACG CAC CTC AAT CTG CCA AGA ATA
6241 GCC TTT TCC CTG GTT CGA CAA AAC GAA CGA CTA GAT TCG GAG GTA ACT ACA ATA GTC TTG
6301 AAC CAG CTG CCG GGG TAA CTA GGA ATA ACA TTG TAT TGG GAA CTC AAA ACT TAG ACG GCG
6361 CCA TTA AAA GGG TAT ATG GAA AAC AAG AAG GTG TTC TAA ACC AAG GTA AAG ATG AGG CCA
6421 AGT TTT TTC TTA TTG CTA TTC AAA TGG TTG CGG AGG CAG CAC GGT TTA AAT TTA TGG AGC
6481 AGG GAA TTG TTA AGG GGG ATA AAA CAA CAG CTT TTA AAG CGA AAA TGG TAG CTT TTC AGA
6541 ACG ATT GGG ATC C
BamHI

Nukleotidsequenz des 2574bp langen Promotorfragments von *BvNPCG2*:

XhoI
1 CTC GAG GAT CTT AGA TGC TCC CTT TAG GAT CTG AGA CAC TCT CAT TAC TAG GAT CTT TGG
61 TTG TGG CGT TCT TGT ATT GTT TTG TCT GTG AGT GAA TGT TAA TAT GGT TCT TTA ATT CAA
121 AAC TGG TGG AAA GAG GGA GAT ATG AGA AGC TTA AAT GTG TAA GCG GAT TTA TGT TAC AAG
181 TTA TTT GTT AGA GAT AGA TCT AAT TAT ATG TAC TCT TCT TAG ATT GAT TCC ATC AAA TTT
241 CAT CAA CCT TAG CAT TTG CCT TCC TGT AGC TTG AAG ACT GGC GAC AAC TGC TTT TGA AGA
301 AAG AAG AAT GCG GAG TAT TGC TTT TGC CCA CAC ACA TGC TCC TAC AAC TCC AAA ATT GCC
361 AGC TCT TAT GCC TAT TTT GAG AAC CAT GTT ATC ATG CAA ATT TGT ATA TAA TCA GAT GGT
421 GTA TGC ACT TTT TTG GAC AAG CTC AAC TAA CAG AGC AAC CTA ATG TAG GAA GGA AAC AAA
481 TTT ACA AGT ATT AAC ATC TTG CCG GCA TTG CTC TAA CCA GGA ACA TTA GTC TTA TAG TCT
541 TAA AGT TAT TAT AGG TTA ATG TGT ATT AGA TAT CTA CGT AAC CGC ATC CAA ATT GCG CAA
601 ATT CTA CAA TAT CCG TAA CAC AAC AAA CAT ACA TCT ACA CTT TGT TTC ATA GCG TGC GAA
661 ACC ACT TTA CTA CTT TGA GGC ACC TAA ACG ACT ACA AAT AGC ACC ATT CTA CTA TTT CGG
721 AGA ATC ATA CAA TGC CTC AAA AAC CAT GTA GAT GTA ATC AAT TTT AGT ACG CAC ACA TAT
781 CCT CCG TGA ATT GAC CAC TGC AAT TCA AAC AAA TAG TGT GCT TAC CAC CTA TTT GAA ATC
841 AAT TAC AAA CAA ATA GCA CCG TAC TTA TTA TAC CTA ACG AAT TAC GAA TAA CAA TTA CGC
901 TAT TTT GGG GTG CCG CGC GCG TAA ACA ACT AAT CTC ATT CAA AAA GGT CAA ATT AGA GAC
961 ATT GTG GTT ACG TAC TGC GCG CCA CCT ACC CCT TTC TCG GGC CTT CAT GAC GTG TCC TAT
1021 CAC AAT CTT CTG TTG AGA TAA TCT TTC CAA CCG CCT AAC CTT TTC TTA TCT TAA TTT TTC
1081 TTT TCC CCT TTT ACC GCC AAA TTA AGC CAC AAA CCC TTG TAC ACA ACT AAA TGC ACG CAC
1141 ATC CGT CTG ATC ATC TAT CAC CCA TGC AAT CTC AGC CGT TTA TTA TTT CTT TTT TGT CCC
1201 CTA TAT ATA TAA TAA TTC CTC CTT TAA TAA ATC TTA TCA TTC ATT CAT TGA ATA CAT CCA
1261 ACA ATT AAA TCT CCC CCT TCT CGA ATT CTC CTT TCT CTC TCC TCC TAT CAT GGC TTC TTC
1321 GCG GTT AGA TCT CTC TCA AGA TCA TCA TTC AAT TCA AAT TTC TTC TTC ATA TTT GAA TAG
1381 ATC GTT CAA AGA TCA ATA ACA TGA TCA TCG ATT TGC GAC GGT TCT TTT TAT CGA TGA TTA
1441 AAT TTC GGT TGA TTT TTT TGA AGG TAA TAA TGT CAG ATC TGA TCT TGT TTT CTC AAT TTC
1501 TTT TCT CAT CCT TTT TTT TTG TTG AAA TTT ATT TGT TTT CTT TGA TTC TTC TTC ATT AGA
1561 CAT GGT GGA TCC TTC ATT GGA GAA GAT CGA TCT GCG TAA CAG TTA ATT GGA TCT GCT TGA
1621 TTC GAG TAA GAT TTT TAT TTT TGT CTT GGA TCT TTG TTT TTC AAT TAT TTT TAC TAG AGA
1681 AAC ATT AAA TCG ATT TCA ATT TTT TGA TTT TAT GTA AGA TGA TTA AGT TAA ATT TAT ATT
1741 TTT TTT TCA CGA AAG TGT TCT CAA TAT TAC GGC TCT GTG CTT ATA TAT GCG TAT TTG ACT
1801 TTT TAA TTC GAT GTT ATG GCT TTC TTT TCT TTA TGC CTT TCA ATT ATT GTC ATT TAT GAA
1861 CTT TAG TTG ATG TTG TTT GTG TTT GAA AAG ATA CTG GTT GAG ATC ATT CGA TCG ACT AGG
1921 ACA GTG ATG AAC TTA TAA TTT GAT GTA TTG TAA ATA TTT AAT CAA CCA GAT CAT TGA TTA
1981 ACT CTT TTG TTT TTG ATC GTT TAA CTC CAG GGG TTC GGG AGT GCC TTT TGC TTG TGG TTC
2041 TGA TTA ATG GTG TCG GAT GAA TGG TAT CTT GGC GAA GTT TTT GTG TAA CCA AAG AAG ATT
2101 GAA AGC TAT GCT GTT TGG CTC TAC GGT ATC TAA TAT TTT TTT AGT GTT TGG TAA TTA GCA
2161 AGT TAT GTG ATT CAT AGT GGG GAG CAT AAG TAG GCA GAT ACA CTT TTT TTT TTT AGT TGT
2221 TTC GAT TAG TTG CTC TTG TTA GTC GTC GAC CTT TGC CAT GTC AGG TGC GCT TGC TTG GCA
2281 GGT CAC CCG ATT TAA TAA AAG TTT TCA TTT GTT GGG TTT TAA GGG GAG ATG GTA CGG GGT
2341 TGT TTT TGC CCG ACT CTC CCC TTT TGT GTC TGT GTC TCT CGC AAA TTT CTT TAC CCC CTT

2401 CCC CCT CCC CCT CCC ATT CTA CGG TAA AAG CTA TTA ATT GCT ACT ACT ACC ACT ATT GTT
2461 GAG CAA ATC AAC ATG CAA ATC GTC TCG TTG GAC AAC AAT GCG GAA TTG CTA AGG TAT CTC
2521 AAT GAC CCC TTT TAA TTC CTT GTT AGG CAT TCA TTG ATG TGC AAA CTT CCC TTT
½ **DraI**

7.2 cDNA Sequenzen der 16 Nach-Ernte induzierten Gene

Die Bindungsstellen der RT-PCR-Primer aus Tabelle 1 (Seite 15) sind unterstrichen.

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *BvHSP83*:

```

1/1                               31/11
ATT CCA GAG TAT CTC AGC TTC GTT AAG GGT GTC GTA GAC TCT GAT GAT CTA CCT CTA AAC
I   P   E   Y   L   S   F   V   K   G   V   V   D   S   D   D   L   P   L   N

61/21                             91/31
ATC TCT CGA GAG ATG TTG CAG CAA AAC AAA ATT CTG AAG GTG ATC AGG AAG AAT TTG GTG
I   S   R   E   M   L   Q   Q   N   K   I   L   K   V   I   R   K   N   L   V

121/41                           151/51
AAG AAG TGC ATT GAG ATG TTC AAT GAA ATT GCG GAG AAC AAA GAT GAT TAC AAC AAG TTC
K   K   C   I   E   M   F   N   E   I   A   E   N   K   D   D   Y   N   K   F

181/61                           211/71
TAT GAG GCA TTT TCG AAG AAC CTA AAG TTG GGT ATC CAT GAA GAT AGC CAG AAC AGG TCT
Y   E   A   F   S   K   N   L   K   L   G   I   H   E   D   S   Q   N   R   S

241/81                           271/91
AAA TTG GCT GAC CTT CTT CGA TAC CAC TCA ACC AAG AGT GGC GAA GAT CTC ACA AGC CTG
K   L   A   D   L   L   R   Y   H   S   T   K   S   G   E   D   L   T   S   L

301/101                          331/111
AAG GAT TAT GTT ACC AGG ATG AAG GAA GGT CAA AAG GAC ATA TAC TAC ATC ACT GGA GAA
K   D   Y   V   T   R   M   K   E   G   Q   K   D   I   Y   Y   I   T   G   E

361/121                         391/131
AGC AAG AAG GCA GTT GAG AAC TCT CCA TTC TTG GAG AGA CTT AAG AAG AAG GGC TAT GAG
S   K   K   A   V   E   N   S   P   F   L   E   R   L   K   K   K   G   Y   E

421/141                         451/151
GTG CTC TAC ATG GTT GAT GCC ATT GAT GAA TAT GCA GTT GGG CAA CTG AAA GAG TAT GAC
V   L   Y   M   V   D   A   I   D   E   Y   A   V   G   Q   L   K   E   Y   D

481/161                         511/171
GGC AAA AAA CTT GTT TCT GCT ACT AAG GAA GGC TTG AAG CTC GAC GAT GAG AGC GAG GAA
G   K   K   L   V   S   A   T   K   E   G   L   K   L   D   D   E   S   E   E

541/181                         571/191
GAA AAA AAG AAA AAA GAA GAG AAG AAG GCA TCC TTT GAA AAC CTG TGC AAG GTG ATC AAG
E   K   K   K   K   E   E   K   K   A   S   F   E   N   L   C   K   V   I   K

601/201                         631/211
GAC GTT TTA GGT GAC AAG GTT GAG AAA GTC GTG GTG TCT GAC AGG ATA GTT GAT TCT CCT
D   V   L   G   D   K   V   E   K   V   V   V   S   D   R   I   V   D   S   P

661/221                         691/231
TGC TGT TTA GTG ACT GGT GAG TAT GGT TGG TCC GCA AAT ATG GAA AGA ATC ATG AAA GCT
C   C   L   V   T   G   E   Y   G   W   S   A   N   M   E   R   I   M   K   A

721/241                         751/251
CAG GCA CTG CGC GAC AGC AGC ATG GGT GCG TAC ATG TCT TCC AAG AAG ACA ATG GAG ATT
Q   A   L   R   D   S   S   M   G   A   Y   M   S   S   S   K   K   T   M   E   I

781/261                         811/271
AAC CCT GAC AAT GGT ATT ATG GAG GAG CTC AGG AAG AGA GCT GAG GCT GAT AAG AAT GAC
N   P   D   N   G   I   M   E   E   L   R   K   R   A   E   A   D   K   N   D

841/281                         871/291
AAG TCA GTG AAG GAT CTT GTG ATG CTG CTG TTT GAG ACT GCA TTG CTA ACC TCT GGC TTT
K   S   V   K   D   L   V   M   L   L   F   E   T   A   L   L   T   S   G   F

901/301                         931/311
AGC CTC GAG GAC CCG AAC ACC TTT GCT GCT AGG ATT CAC AGG ATG CTA AAG CTC GGG TTG
S   L   E   D   P   N   T   F   A   A   R   I   H   R   M   L   K   L   G   L

961/321                         991/331
AGC ATT GAA GAG GAT GAT GCT GGT GAA GAT GCT GAT ATG CCT GCT CTG GAA GAA GAT ACT
S   I   E   E   D   D   A   G   E   D   A   D   M   P   A   L   E   E   D   T

```

1021/341
GCT GAG GAA AGC AAG ATG GAG GAA GTT GAT TAA GGT TGT TCC TTT GGG AGT TTT TTT TGT
A E E S K M E E V D *

1081
CTA CCA TTG TTG ATA TCC CAG ACA CAC TAT ATC TCG GTC GAA CAA GGA TAG TAT GAT ATT

1141
AGT AGT TTG TTG GGT CTA GTG GTG TTG AAG TAC CCT CTA GTT TTC CAT GTC TTG AGT TCG

1201
ATT TGT GTC TTT TTT CGA TCA GAA CTT AAT TGT GCT ACT CTT TTG TGA CTT GAT CGA GTT

1261
CAA TAG TTG GAT CTT TTT CAG TCA TT

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *BvCPRX1*:

1/1
CAT TAA CCT AAT TGA GAT TCT TAT AGC AAG TTT TGC ATA TAT AGA ATA TGA GAG AAA CCT
M R E T S

61/21
CAT TTT CCT TTG TTC TTT TTC TTG GGC TTG TTT TAA TAA CAC TTG TTG GCC ATT GTT ATG
F S F V L F L G L V L I T L V G H C Y G

121/41
GAC AAC TCA AAG TAG GGT TTT ACG AAG GTA AAT GTG GGA AAA ATG ACG TCG AAA AAG TCA
Q L K V G F Y E G K C G K N D V E K V I

181/61
TTC ATG AAG TGG TGA AGA AGA AGA TTA CGA AAG ACC CAG ATA CCG TGT CTG ATC TTG TTC
H E V V K K K I T K D P D T V S D L V R

241/81
GTC TAT CAT TCC ATG ATT GTT TTG TCA GGG GTT GTG ATG GAT CAA TAT TAC TCG ATG GAG
L S F H D C F V R G C D G S I L L D G A

301/101
CTA ATA CAG AGC AAA AAG CAC CAA TAA ATC TAG CAC TTG GAG GCT TTG AAG TTG TTA AGG
N T E Q K A P I N L A L G G F E V V K D

361/121
ATA TTA AGG AAG CTA TTG AAA AAG CAT GCC CAG GAG TTG TAT CTT GTA CTG ATG TTA TTG
I K E A I E K A C P G V V S C T D V I V

421/141
TAA TAG GTG CTA GAT CTG CAA TAT CCT TGG CAG GAG GAA AAT GGT TCG AGG TAG AAA CTG
I G A R S A I S L A G G K W F E V E T G

481/161
GAA GAA GAG ATG GAG TTG TGT CAC TAA AAA GTG AAG CAC AAG CAA ACA TCC CTC CAC CAA
R R D G V V S L K S E A Q A N I P P P T

541/181
CAA TGC CGG TTT CTC AAG CAA TTC AAT TGT TTG CCA AGA AAG GGC TCA ACA AGG ATG ATT
M P V S Q A I Q L F A K K G L N K D D F

601/201
TTG TTG TTC TTT TAG GTG GAC ATA CTG TTG GAA CTT CAA AAT GTC ACT CAT TCA AAG AAC
V V L L G G H T V G T S K C H S F K E R

661/221
GTC TAT ATA ATT TCC GCA ACA CCA AAA AAC CAG ACC CAA CTA TTA GTT CAT CTT TAC TTC
L Y N F R N T K K P D P T I S S S L L P

721/241
CAC TAT TAA AAA AGA CAT GTC CTC TTA ACA GCA AAA TTG ACA ATG AAA CAT TCC TTG ATC
L L K K T C P L N S K I D N E T F L D Q

781/261
AAA CTC CAA ACA GCC ATT TCA AGA TTG ACA ATG CCT ACT ACA AGC AAA TTC TTG CAC ATA
T P N S H F K I D N A Y Y K Q I L A H N

841/281
 ATG GCG TTT TGG AGA TAG ATT CGA ACC TAG CGT CGA ATC CAG GAA CTA GAG GAC TAG TTA
 G V L E I D S N L A S N P G T R G L V K

901/301
 AGG GAC TAG CAT ATA ATC CTA ACA AGT TTC TGA ACC AAT TTG GTC CAG CCA TGG TCA AGA
 G L A Y N P N K F L N Q F G P A M V K M

961/321
 TGG CTA GAA TTG GAG TCC TCA CAG GTT GCC ATG GGG AGA TAA GGA AAA CTT GTA GTT CTG
 A R I G V L T G C H G E I R K T C S S V

1021/341
 TTA ATT AGA GTA TCT CGT AAT TTA ATT TAA TAC TAG TCT TAA TTA TAT GCA CAC GAT AAG
 N *

1081
 TAC GTT AAT TTT AAA ATA TAG TGT CTT GTA TCT ATT TTA GAA TGA AAA GTT GAA ATG AGA

1141
 AAG AGT TCT TAA GGG ACT GTT CGG CAT CAC TGT AAG TTT TCA GTT TTT GGT TTT ATG AAT

1201
 ATA AAA GTC ATA TGA TAT

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *BvRIP-r1*:

1/1
 CCT TCA TCC ACT CAA CGC CTT AGC TAC ATG CAT TAG TGT GAC AAG AAA AAT ATG AAG GCA
 M K A

61/21
 TTG ACA GCA GCA AGA TGG ATT CAG TGG TGC ATT ATA ATG GTA GTG GTG ATT GTA CCA ATA
 L T A A R W I Q W C I I M V V V I V P I

121/41
 ACA GCA ACA ACA ACC GAA GAT GAG GCA GTT GGC AAG AAA CTA AGC TAC ACC ACC GTA ACA
 T A T T T E D E A V G K K L S Y T T V T

181/61
 TTC GAA CTA AAA TAC GGT GTT GAG CCA TTA AAA GGA TAC TCA AGT TTC TTA ACA AGA CTC
 F E L K Y G V E P L K G Y S S F L T R L

241/81
 CGC AAT GCA GTG GAA GCC CCC ACC AGG GCT TGC GGC TTA CAA TTT ACG CGA AAA GTT CCA
 R N A V E A P T R A C G L Q F T R K V P

301/101
 TTA ACA GGC AAA CAA TAT GTT TTA GTA GAC CTC AAG TTT AGC AAC ACA CAA TGG GTG ACT
 L T G K Q Y V L V D L K F S N T Q W V T

361/121
 TTA GGA ATT GAC GCC AAA GAT TTA TAT GTG TGG GCT TAC CAA GAC AAT GTA AAA TAC AAT
 L G I D A K D L Y V W A Y Q D N V K Y N

421/141
 GGT AAA TTT CGG GCT AAT TTC CTA GGT GAC GCA CCT CAA TCT GCC AAG AAT AGC CTT TTC
 G K F R A N F L G D A P Q S A K N S L F

481/161
 CCT GGT TCG ACA AAA CGA ACG ACT AGA TTC GGA GGT AAC TAC AAT AGT CTT GAA CCA GCT
 P G S T K R T T R F G G N Y N S L E P A

541/181
 GCC GGG GTA ACT AGG AAT AAC ATT GTA TTG GGA ACT CAA AAC TTA GAC GGC GCC ATT AAA
 A G V T R N N I V L G T Q N L D G A I K

601/201
 AGG GTA TAT GGA AAA CAA GAA GGT GTT CTA AAC CAA GGT AAA GAT GAG GCC AAG TTT TTT
 R V Y G K Q E G V L N Q G K D E A K F F

661/221
 CTT ATT GCT ATT CAA ATG GTT GCG GAG GCA GCA CGG TTT AAA TTT ATG GAG CAG GGA ATT
 L I A I Q M V A E A A R F K F M E Q G I

721/241
GTT AAG GGG GAT AAA ACA ACA GCT TTT AAA GCG AAA ATG GTA GCT TTT CAG AAC GAT TGG
V K G D K T T A F K A K M V A F Q N D W

781/261
GAT CCA ATC TCT CAA GCA ATT CAT AGA GCA GAA GCT GCA GCA CGT AAA TGC ACG ACG ATT
D P I S Q A I H R A E A A A R K C T T I

841/281
TCG CCA ACG CTG GTA ATC AGT AAC ACT GGA TAC AGG CAG GAG GTA AAC CGA GTG GAC GCA
S P T L V I S N T G Y R Q E V N R V D A

901/301
GTT AAA AAT GAC ATG GGC CTT CTC AAG TAT AAA TCC ATC GGC TCA AGT GTT GTA AAC TCT
V K N D M G L L K Y K S I G S S V V N S

961/321
ATT CTA GCT GAT GAT GGT GGC AGT AGT CTA GAA TTT CTG GAA TCT GCA GTT CTG TGA TTG
I L A D D G G S S L E F L E S A V L *

1021
ACC AAC CAA TCA AGT AGC CGG CGG CTT AGT TAA TTA ATC ACT GCT AAT AGT AGT CTT TGG

1081
TCA TGT GGG GCT TCA TTC AGA AAA TTT AGA TGG ACA ACT TGT TGC TTC AAT TAT TGT GTG

1141
CGT TGT ATT ATA TTA TCT GGA GTA CGA ATT TAA AAA GGA TCA TAT TGT AAG TTC

751/251
GCG AAA ATG GTA GCT TTT CAG AAC GAT TGG
A K M V A F Q N D W

811/271
GAA GCT GCA GCA CGT AAA TGC ACG ACG ATT
E A A A R K C T T I

871/291
TAC AGG CAG GAG GTA AAC CGA GTG GAC GCA
Y R Q E V N R V D A

931/311
AAA TCC ATC GGC TCA AGT GTT GTA AAC TCT
K S I G S S V V N S

991/331
GAA TTT CTG GAA TCT GCA GTT CTG TGA TTG
E F L E S A V L *

1051
TAA TTA ATC ACT GCT AAT AGT AGT CTT TGG

1111
TGG ACA ACT TGT TGC TTC AAT TAT TGT GTG

1171
TAA AAA GGA TCA TAT TGT AAG TTC

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *BvRIP-r2*:

1/1
CTG CCT TTT TTT GTG CTC AAT TTC ATC CCA ACT TGG CAT GTA TAG CAT CTC CTT TCC GAT

61/21
TAT TTT ATG CCA AGT TGC CAA CTT AAT GGA TAA GTT GGA AGT TCG CCT ATT TAA AGT GGA

121/41
TCA TGT TTT GTA ATA CTG AAG AGC GCC ATA GAC ACG GGA ATT TCA CTA AGA TTC CAC CAA

181/61
AAC ATA GCT TTT TCT GTA CTA GGT GCA CGA GAA TAA GAA TGA AAG AAA AAA TGA CGA ATT
M T N C

241/81
GTT TTC TGG TGG TCG TTC TAG CAA TAT GGA TCG TCC CTG CTA TTG TAC CTA CTA AAG CAT
F L V V V L A I W I V P A I V P T K A S

301/101
CCG ACG TGA GCT TGA ATC TGT TAA CTG CTG ACG AGA GTG ACT TCT CCC GAT TTT TGA CCG
D V S L N L L T A D E S D F S R F L T E

361/121
AAA TGC GCG TTA ATT TGA CGG ACC CGA ACA TCA GCT ACG GTG GCA CTC ACC TAC CAG TTA
M R V N L T D P N I S Y G G T H L P V M

421/141
TGG CTG CTT CAA CAA ACT TTA TTT TGG TCG ACC TCG AAT TCG AGA AAG GAA CGA TGA CAC
A A S T N F I L V D L E F E K G T M T L

481/161
TCG CTT TTA GAA GAA GCG ATT TAT ATT TGG AGG GCT ATC TTG ATC AAA TTG GTG GAA ATT
A F R R S D L Y L E G Y L D Q I G G N Y

541/181
ATA GAG CGC ATT TCT TTC TTG ATG CTT CTC CAG AGG GAA AAG CTA GTC TTT TCC CAA ATG
R A H F F L D A S P E G K A S L F P N A

601/201
CTA GAG GTG CTA ACA ATC GTA TCA TAA TGT TTT ATA AAG GTT CAT ATC CTG ATA TTG AGA
R G A N N R I I M F Y K G S Y P D I E K

661/221
AAG TTG CTA AGG ATA GAA GCA AAA TAA GCC TTG GAA TTT ATG AGC TTA GAA AGC TAA TGA
V A K D R S K I S L G I Y E L R K L M I

31/11
ACT TGG CAT GTA TAG CAT CTC CTT TCC GAT

91/31
TAA GTT GGA AGT TCG CCT ATT TAA AGT GGA

151/51
GAC ACG GGA ATT TCA CTA AGA TTC CAC CAA

211/71
GAA TAA GAA TGA AAG AAA AAA TGA CGA ATT
M T N C

271/91
TCG TCC CTG CTA TTG TAC CTA CTA AAG CAT
V P A I V P T K A S

331/111
ACG AGA GTG ACT TCT CCC GAT TTT TGA CCG
E S D F S R F L T E

391/131
TCA GCT ACG GTG GCA CTC ACC TAC CAG TTA
S Y G G T H L P V M

451/151
ACC TCG AAT TCG AGA AAG GAA CGA TGA CAC
L E F E K G T M T L

511/171
AGG GCT ATC TTG ATC AAA TTG GTG GAA ATT
G Y L D Q I G G N Y

571/191
CAG AGG GAA AAG CTA GTC TTT TCC CAA ATG
E G K A S L F P N A

631/211
TTT ATA AAG GTT CAT ATC CTG ATA TTG AGA
Y K G S Y P D I E K

691/231
TTG GAA TTT ATG AGC TTA GAA AGC TAA TGA
G I Y E L R K L M I

```

721/241
TTC AGG TTT ATG GAC AGA GCA AAG TTG ATG TTC CAA CCG AAG CTA AGT TAA TGC TTC TTT
  Q  V  Y  G  Q  S  K  V  D  V  P  T  E  A  K  L  M  L  L  F

781/261
TCA TCC AAA TGA TTT CGG AGG CAG CAC GTT TCA AGT ACA TTG AGA ACA AGA TTT TGG AAA
  I  Q  M  I  S  E  A  A  R  F  K  Y  I  E  N  K  I  L  E  T

841/281
CTT TTT ACA TGT CTT TTA AGC CGG ATC CGA AGA TAT TGA AAT TGG AGA CAA GTT GGC AGG
  F  Y  M  S  F  K  P  D  P  K  I  L  K  L  E  T  S  W  Q  A

901/301
CAA TTA CCG TCG GTA TAC GAA ATT CTA GGA ATG GAG TAA TCT CAC CAG CTC TTA AAT TGG
  I  T  V  G  I  R  N  S  R  N  G  V  I  S  P  A  L  K  L  D

961/321
ATG ATG TTA ATG GTA GGG ATT GGA TAG TAT CTC GAG TAC AAG ACA TAG TTG ATG ACA TGG
  D  V  N  G  R  D  W  I  V  S  R  V  Q  D  I  V  D  D  M  A

1021/341
CCC TCT TAA AAT ATG AAG GTC CTA GCA CAA CAT TTA TAT CTT TGG TGG GCA ATA ACA ATG
  L  L  K  Y  E  G  P  S  T  T  F  I  S  L  V  G  N  N  N  G

1081/361
GTG GTG ATC ACG CTA AAA TCT GAA AAC CTT GGA TTT GCA TTG TGT TAT TCA TGC TGG AAT
  G  D  H  A  K  I  *

1141
CTG CTA TAG TAT TGG ACT ATT GGT GAT GCT GGT TTT ATT TCT TTG ACG CTT TCT GAT GAA

1201
TGT ACT ATA TGA AGT CCG TCG AGT GTT GTT TAC TAA GTC GTG CTT ATC TTA TCC TCT ACG

1261
TAC GTA CGT ACT TTT TGC GTT TGA TGT AAC CTC AAT AAG ATC AAC GTG ATG TTT TCG ATT

1321
ATC TTT TAG GTA TAT ATG GGT TCT TCT TAT TAT TGT TGA TAT CGT ATG ACA ATT TAT AAA

1381
TGA TAA GTT CAC AGT T

```

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *BvB12D*:

```

1/1
TTT TCT CTC TTT GTC GAC AAG ATC GCC GGC GAT TTT CCG ACG TAA AAA AAT GGC CTC TGT
                                     M  A  S  V

61/21
TAA CCG TTG GGT GCG GCC TGA GGT ATA TCC TCT GTT TGC GGC CGT TGG AGT TGC TGT TGG
  N  R  W  V  R  P  E  V  Y  P  L  F  A  A  V  G  V  A  V  G

121/41
TAT CTG CGG TGT TCA GCT TGT TCG TAA TAT TTG CAT TAA TCC TGA AGT CAG GGT TAG TAA
  I  C  G  V  Q  L  V  R  N  I  C  I  N  P  E  V  R  V  S  K

181/61
GGA GAA CAG GGC AGC TGG AGT TCT TGA AAA CTT TTC AGA GGG AGA GAA GTA CGC TGA GCA
  E  N  R  A  A  G  V  L  E  N  F  S  E  G  E  K  Y  A  E  H

241/81
TTT TCT GAG GAA ATA TGT CCG CAA TAA AAC TCC AGA GAT TAT GCC TTC TAT CAA CAG CTT
  F  L  R  K  Y  V  R  N  K  T  P  E  I  M  P  S  I  N  S  F

301/101
TTT CGC TGA TTC AAC TCG CAA TTG AAA GGC TCT ACT TAA ACT TGA TTT TAA AAA GAT TAG
  F  A  D  S  T  R  N  *

361
CTT CAG TTT TTC AAA ATT ACG TTG CAA TTT GTG ATC GTA ATT TAC ACA TTA TTG TTT TGG

421
TAA AGA GCT TGT GTT TAT CTC CAT TTG ATG TAT TTG TTT GAT TAT ACA CTC ACA GCC TGC

481
TGA TTT TGT TTC TTG GAG TGG TCA GCC TGT TGA ATT ATA AGA AAG GTT CAT GTA GCT TGC

```

541

TAT TTG AAG CTT GAA AC

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *BvGLP-r*:

1/1 31/11
AAA ACA AAC ATG GAT GCT CTA AAA ATT GTC TTT CTC TTT GCT CTT CTC GTT CCA CTT TCA
M D A L K I V F L F A L L V P L S

61/21 91/31
TCT GCC ACA CTT GTG GTT GAT TAC TGT GTC GCA GAT TTC AAT TTT CCG GTT GGA CCA GCA
S A T L V V D Y C V A D F N F P V G P A

121/41 151/51
GGA TAC CCT TGT AAA AAT CCT GCA ACC CTT ACT GCA GAT GAC TTT GTT TTC TCG GGT TTG
G Y P C K N P A T L T A D D F V F S G L

181/61 211/71
GGT GTC GCA GCT AAC AGT ACA ACT ACT CCA TTC AAT GCT AGT TCG GTT TTT GCA GTC GAT
G V A A N S T T T P F N A S S V F A V D

241/81 271/91
GTT ACG TTC CCA GCC TTG AAT GGT CTA GGA CTG TCC ATC GGA CGC TTA GAC ATT GGT GTA
V T F P A L N G L G L S I G R L D I G V

301/101 331/111
GGT GGA GCT GTT CCG ATT CAC TCA CAC CGA GCA TCA GAA GTT ATT CTT GTA AGC GAG GGA
G G A V P I H S H R A S E V I L V S E G

361/121 391/131
ACA ATA ATT GCT GGT TTT ATA GAC ACA AAT AAC ACG GCT TAC TAC AAA ACA TTA AAT AAG
T I I A G F I D T N N T A Y Y K T L N K

421/141 451/151
GGG GAT ATT ATG ATT TTT CCA CCT ACA TTA CTT CAC TTT CAA GTT AAC GTT GGT AAA TCT
G D I M I F P P T L L H F Q V N V G K S

481/161 511/171
CCT GCT CTT GCT TAT GTT ACG TTG AAT AGT GCA AGC CCA GGC TTT GAA ATC ACT ACT TTT
P A L A Y V T L N S A S P G F E I T T F

541/181 571/191
GCT CTA GCT GGC AAT GAT TTT CCT AGT GAT TTG ATT CAG AAG ATA ACA TTG GTT GAT ACT
A L A G N D F P S D L I Q K I T L V D T

601/201 631/211
GCA CAA GTG AAG AAA TTG AAG AGA ATC TTT GGG GGT ACT AAT TAG TAA TTC TAA TTC TAT
A Q V K K L K R I F G G T N *

661 691
TAT ATA TAC ATA TAT GGT GTT TGG GCT AGC TTG TAT TTC ATT TAT GTT CTT ATA TAT AAT

721 751
ATC TTA TAT ACA TGC CAA GCT CAA ATT GAA TAA AAA AAA GAT GTA CTG ATA TTC CTA TTT

781 811
ATA TGA TGC TGA AAA AAA GCT ACA AGA AAA AGA TAT ATT TTT TCT GTT TC

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *BvSP2*:

1/1 31/11
CTA CCA AAA AAA AAT GGC ACT TCT TTT GAA AAA CAC CTT ATA TAT AGC CTT AAT CAT CTC
M A L L L K N T L Y I A L I I S

61/21 91/31
AGT AAT CTC ATC ATT CCC AAC TTC ATT GTT TGC ACA AAA CTG TGG GTG TGC CCC TAA CCT
V I S S F P T S L F A Q N C G C A P N L

121/41 151/51
ATG CTG CAG CAA TTT TGG GTT CTG TGG CAC TGG AAC ACC TTA TTG TGG TGT TGG TAA CTG
C C S N F G F C G T G T P Y C G V G N C

181/61
TCA ATC TGG CCC ATG TGA GGG TGG CAC TCC AAC TAC GCC GAC TAC TCC AAC CAC TCC TAC
Q S G P C E G G T P T T P T T P T T P T

241/81
TAC GCC AGG AAC TGG TGG TGG TGG CTC ATC AGT GTC TGA TAT AGT GAG TCA AGC ATT CTT
T P G T G G G G S S V S D I V S Q A F F

301/101
TGA TGG GAT TAT AGG CCA AGC TGC TGC ATC TTG TCC TGG GAA AAA CTT TTA CAC TCG CGC
D G I I G Q A A A S C P G K N F Y T R A

361/121
TGC TTT TCT TAG TGC GGT TGA TCC TAA GTT TGG AAA CGA AGG TTC CAG TGA TGA TAA CAA
A F L S A V D P K F G N E G S S D D N K

421/141
GAG AGA AAT CGC TGC CTT CTT TGC TCA TAT CTC GCA TGA GAC TAC CAA TTT GTG CCA CAT
R E I A A F F A H I S H E T T N L C H I

481/161
AGA AGA AAG AGA TGG AGA TGT TGG TGA CGC CTA CTG CGA TCA AGA CAA GGC AGC TCA ATA
E E R D G D V G D A Y C D Q D K A A Q Y

541/181
CCC TTG CGC TGC AGG CAA GAA GTA CTA CGG GAG AGG GCC TCT TCA ACT GTC ATG GAA CTA
P C A A G K K Y Y G R G P L Q L S W N Y

601/201
CAA CTA TGC TCT TGC AGG ACA GGC GAT CGG ATT TGA TGG TCT TGG AAA CCC TGA AAA GGT
N Y A L A G Q A I G F D G L G N P E K V

661/221
GGC TAC TGA TGT TAA TAC ATC TTT CAA GGC TGC AAT GTG GTT TTG GAT GAC TAA TGT TCA
A T D V N T S F K A A M W F W M T N V H

721/241
CTC CGT TAT GAA CCA AGG TTT TGG AGC TAC CAC CAA AGC TAT TAA TGG CGC GCT TGA ATG
S V M N Q G F G A T T K A I N G A L E C

781/261
CAA TGG CCA AAA CCA GGA TCA AGC TAA TGA CCG TAT TCA GTT TTA TAA GAA GTA TTG TGC
N G Q N Q D Q A N D R I Q F Y K K Y C A

841/281
TGA TTT TGG TGT TGC TCC TGG TGA TAA TCT TAC ATG TTA ATT TGG ACA AGT TAC AAC TTA
D F G V A P G D N L T C *

901
CAA GTA TAT CTC AAT ATA GTA CTT CTA TAT GAT ATA TAC AAT TAT ACA TGC ATG TTT ATT

961
AGT TGC AGT GAG GTA CTT AAT TTG CTG AAT AAA ACA CAG ATA CTA TGT AGT ACT AGA ATA

1021
TTG TTC TTT CTT GAT CTT GCT CTG AAC AAT GAA TAT ATA ATA AAA GGA ATT ACT TGA GCA

1081
TTT C

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *BvC561R*:

1/1
CAT AGA ACT GCA TGT ATA TCA TAT TAT TAC TGT TAA ACA AAC TTT CAA ATC CAT AAT ATA

61/21
GTG CTC TCA AAA AAA AAA AAA AAA AAA GCA GAA GCT TCA AAA ATG GTG TCA TGG AAG AGC
M V S W K S

121/41
ATA ACA TTT TTG GCT CTC TCT CTC ATC ATT CAT GTT CCA TTT GCT TCT TGC TCG TCT CTC
I T F L A L S L I I H V P F A S C S S L

181/61
AAA GAG GCA GTC CCC GCT TTC AGT CAC ATT AAA GAT AAA AAT CAC AGT GCT GAT CAA CTA
K E A V P A F S H I K D K N H S A D Q L

241/81
 AGC TCC AAG ATG ACA TAT GAA GTA AGA CTT CAC GGG CTT CTG TTA TGG GCA TCC ATG GGA
 S S K M T Y E V R L H G L L L W A S M G
 301/101
 TTC CTT ATG CCC ATA GGG ATA CTA ATA ATC AGA TTA TCC AGC AGA GAG GAA TGT GGA ACT
 F L M P I G I L I I R L S S R E E C G T
 361/121
 AGA CTC AAA CTT TAT TTT TAC CTC CAT CTC TTT CTA CAG ATG CTA TCA TTG TCC ATT GCC
 R L K L Y F Y L H L F L Q M L S L S I A
 421/141
 ACT GCT GGG GCA ATT AAG TCG ATC AAA ACT TTC GAG AAT TCT TTC AGT AAC AAC CAT CAA
 T A G A I K S I K T F E N S F S N N H Q
 481/161
 AAA ATT GGT CTA GCA CTT TAT GGC GCA ATT TGG GTA CAG GCC GTG ATT GGA TTT TGT AGA
 K I G L A L Y G A I W V Q A V I G F C R
 541/181
 CCA CAT AGA GGA ACT TCA AAA AGG AGT TTA TGG TAC TTC CTT CAT TGG GTG TTT GGC ACT
 P H R G T S K R S L W Y F L H W V F G T
 601/201
 ATT ATT TGC ATC GTC GGA ATA CTA AAC ATC TAC ACC GGC ATA GAG GCG TAC AAA AAG AGG
 I I C I V G I L N I Y T G I E A Y K K R
 661/221
 ACT AAA AGA AGT ACG ACA CTT TGG ACG ATT CTA TTC ACA GTT GAA ATT TCT TCC ATA GCA
 T K R S T T L W T I L F T V E I S S I A
 721/241
 TTT TTA TAT CTT TTC CAA GAC AAA CGA GAT TAC TTG CAA AAG CAA GGT GTT TAT ATA AGA
 F L Y L F Q D K R D Y L Q K Q G V Y I R
 781/261
 GAA GGT GGA CAA GTA AGG CCT TCG AAT GAT CAA GAG AGC TCT TTA AGA GAC AAC CAA AAA
 E G G Q V R P S N D Q E S S L R D N Q K
 841/281
 GAT TTA TGG AAG GAG CCA TGT CCA AAA GTT AAT GCA TTA AAA AAT TTG TTC AAC TGA TTA
 D L W K E P C P K V N A L K N L F N *
 901
 ACA TTG AAC ATT TTC TTT ATT TTG CTC TAT TTT TTT AGT TTC TCT CTT TAT TTG GCA ATG
 961
 CTA ACT CTA TAC CAA GTG GAT GCT TCT AAC GCT TTC GGA AGA TTG TAT TTT CAA AAC CTA
 1021
 ACG AAT TTT AGA TAT TAC ACA TCA TTA AAT TGA TTT TAA TGA AGT GTG TAG CCA TAT TAG
 1081
 GAA TAC ATA TTG TAT GTG GTA ATT CTA AAT ATT CTT GTC TTT GAA TTT TTG TTA CTA TCA
 1141
 TTT TTA GAT GCT AAA TAA ACA TTT ATT ATG GTA CAT TGT ATT AGG CCT TAA AAG GTT TAA
 1201
 TAT TTA TTT TAA TAT AAA GAC CCA ATC ATA TTG TGA AGT CCA TGA AAG AAA GTC AAC AAA
 1261
 AGT CAA TGA TTA ACT AAG GTC TTC TGG AGA TGA AAG GCA ACC CAA GAC AAG GGT ATG AGC
 1321
 AGT TAA CAG GAT GAT CAT AGA ACA AGC TAC GTA AGC AGG AAC GTG TGT ACT TCA GCG CCA
 1381
 GAA AGC AGT TAT GAT TTG AAG CAA AGA TGA TTC AAA TCA TTT TTC TCC AAA GAT ATA TGG
 1441
AAG TTA CGT AGC ATA TTG GTG TAT AAA TAC AAG GGA GAT GAT CAA GCC AAC GAC AAT AAA
 1501
 GAC AAC ACA CAA CAA CTT GCA AAT TAC TTT CTA GCG TAG CCT AGC CTA GCC TAG CCA ACC
 1561
 CCC TTA TGG GGT TAT AGT TTA GTT TGT AGA CTT GAA GCA TGT ACT AGT GAC GAG TTT GTT

1621 CAT TCT CTA GTT AAA GCA GGA ACT CAT GGA GGG AAT AAT CTT TGT GTT TTC CCT TTA TTT
 1681 ATC CAA CCT GGA TTA TCC TCA TAT GTG TTG TAA AAC TTA TTC TAA AAG TTT GTG ATG TGA
 1741 ATG AGA ATA TAT GGC TCT AAT TAA TAG ATT AAT TAT TAC ATC TTG TTC T

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *BvBPM1*:

1/1 31/11
 ACT ATC TCT TTC TCT CTT CTT TTA AAA AAA AAC ACA ATA ACA ACA TGA CCA AGG ATG TGG
 M T K D V E

61/21 91/31
 AAG CAG TTT CAG AGC AGC AAC AGC CTG AAT TTT CAA CAA AAG ACT ACC ATG ACC CTC CAC
 A V S E Q Q Q P E F S T K D Y H D P P P

121/41 151/51
 CAG CTC CAC TAA TTG ATA TGG AGG AGC TGA AAA AAT GGT CAT TTT ACA GAG CTA TCA TAG
 A P L I D M E E L K K W S F Y R A I I A

181/61 211/71
 CGG AGT TTG TTG CTA CCC TAC TCT TCC TTT ATG TTA CTG TAC TCA CTG TGA TTG GCC ACT
 E F V A T L L F L Y V T V L T V I G H F

241/81 271/91
 TCA GAA GTG CTG ACC TTG AGA ACG GCG GCG AAA ATT GTA CTG GCG TTG GAA TTC TCG GTA
 R S A D L E N G G E N C T G V G I L G I

301/101 331/111
 TCG CTT GGG CCT TTG GTG GCA TGA TCT TTA TCC TTG TCT ACT GCA CTG CCG GAA TCT CCG
 A W A F G G M I F I L V Y C T A G I S G

361/121 391/131
 GAG GAC ACA TCA ATC CAG CAG TGA CCA TTG GGC TAT TTT TGG CAA GAA AAG TGT CAC TAA
 G H I N P A V T I G L F L A R K V S L I

421/141 451/151
 TTA GGG CAC TTG CCT ACA TGG TAG CTC AAT GTC TTG GTG CCA TAT GTG GTG TTG GGT TCG
 R A L A Y M V A Q C L G A I C G V G F V

481/161 511/171
 TAA AAG CCT TCC AAA GTG CAT ACT ATG ATA GGT ATG GTG GTG GTG CTA ACC AGA TGT CTC
 K A F Q S A Y Y D R Y G G G A N Q M S H

541/181 571/191
 ATG GTT ACA ACA AGG GTA CTG GTC TTG GTG CTG AAA TTA TTG GTA CCT TTG TTC TTG TAT
 G Y N K G T G L G A E I I G T F V L V Y

601/201 631/211
 ACA CGG TCT TTG CCG CTA CTG ACC CCA AGA GGA GCG CTA GGG ATT CCC ATG TTC CTG TAT
 T V F A A T D P K R S A R D S H V P V L

661/221 691/231
 TGG CAC CCC TAC CCA TTG GTT TCG CGG TAT TCA TGG TTC ACT TGG CTA CCA TCC CAA TCA
 A P L P I G F A V F M V H L A T I P I T

721/241 751/251
 CTG GAA CTG GCA TCA ACC CTG CTA GGA GTT TTG GAG CTG CCG TAA TTT TCA ATG AGG AGA
 G T G I N P A R S F G A A V I F N E E K

781/261 811/271
 AAT CCT GGA ATG AAC ACT GGA TTT TCT GGG TAG GAC CAT TTG TTG GTG CAG CAA TTG CAG
 S W N E H W I F W V G P F V G A A I A A

841/281 871/291
 CAT TTT ACC ACC AAT ACA TTC TTA GAG CTG GTG CAA TCA AAG CTC TAG GAT CCT TCA GGA
 F Y H Q Y I L R A G A I K A L G S F R S

901/301 931/311
 GCT CTG CTT AAT CAA ATG AAG AAT GAA ATT TGT GCT TAT TTA TTA TGG AGT TTG AAA AGA
 S A *

961/321 991
TGG AGA GAG AAA GGA CCA TAT AAA ACT GTA GAT AAC AAA AAT GGG GTC AAC AGT GGA CTA
1021 1051
TAT TAT CTT ATC CAG GGT GTC TTT GGT TAC TTT CTC TGT GTT TGT ACT CTT ACC ACT TTT
1081 1111
TTT TGT ATG TTT TTT CTT CTT ATT GGT GTA AGC TGT TTT TTA TTC TCT TGT GTA CTT GTG
1141 1171
TGG GTG ATT GCA CAT AAT TAT AGT ACA TTA TCC TTG TTT TTT GGT TGG T

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *BvPSK*:

1/1 31/11
CCC AAG TTC CAT ACA TCT CTC TTT CTC TCT CCT CCT AGC TCA CAC ACC AAC TCT ACG TAT
61/21 91/31
TTG CAA CAA AAC AAA ATT CTA CCA TAT ACA ATA ATG TCC AAA TTC ACA ACT CTT CTT ATA
M S K F T T L L I
121/41 151/51
ATA GTT ATG CTA GTT TGC TTC GCA AGT ACT GAG ACT TGT GTA GCT CGT ACT ATA CCA GCT
I V M L V C F A S T E T C V A R T I P A
181/61 211/71
TTT CAT CAT GAG GAT ATG GAT TTT GAG AAT TTG AAG GTC GAT GAT AAT AAG AGT TGT CAA
F H H E D M D F E N L K V D D N K S C Q
241/81 271/91
GGA GTA AAT GAA GAG GAG TGT TTG ATG AGG AGG ACA CTT GTG GCT CAT ACT GAT TAT ATC
G V N E E E C L M R R T L V A H T D Y I
301/101 331/111
TAT ACT CAA CAT CAA AAT CCT TGA AAT TAT AAT TAG TTT TGC TTA TTA CTA CTA TAT GAG
Y T Q H Q N P *
361 391
TTT AGC CTT ATC TTA TAT AAG TAT AAA GGA TGC TCT GTA AAT TTG ATT TAG TAC TTA GTA
421 451
GTA GAA TAT ATG ATT TTA AAT TTT GCA AAG GTT TTC TTT GGC CTA ATA GTA CAT GAT TTT
481 511
TAT TAG TCG TGT GTG GTA TGT AAG ATT TTA ATC TGA TCG ATC

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *BvRCC*:

1/1 31/11
CAT GGA GAC TCC TGA AGT ACC AAT CCG CAA CCC AGC ACA CAA GAT CAT AGC CGT TAC CGC
M E T P E V P I R N P A H K I I A V T A
61/21 91/31
AGG CGA AGC TCA CAC TCT CGC TCT TTC CGA GGT TGG GAA GGT ATT TTC ATG GGG ACG AGG
G E A H T L A L S E V G K V F S W G R G
121/41 151/51
CAC ATT TGG ACG ACT TGG AAA TGG TTC TGA ATC CGA TGA GAG TTT TCC GGT GCC CAT AAA
T F G R L G N G S E S D E S F P V P I K
181/61 211/71
ATT GGA TAA TGA TGG GTC CCT CAA TGA AAA GCC CCT CAA TTT TGT GGG TAT TGC TGC TGG
L D N D G S L N E K P L N F V G I A A G
241/81 271/91
TGC TTA TCA CAG TCT TGC CCT TGC TGA TGA TGG ATC AGT GTG GTG CTG GGG CTA CAA TAC
A Y H S L A L A D D G S V W C W G Y N T
301/101 331/111
CTA TAG CCA ACT TGG ATT TGA TGG AGA TAA TGT ATC AGT TCC CCG TCA ATT AGA TAA GTT
Y S Q L G F D G D N V S V P R Q L D K L

361/121	391/131
ACT TCA GTT AGA TTC TCC CCG ATC TCT CGG	TGA TGA CTC AAA GGG TAA GAG TAA ACA TCC
L Q L D S P R S L G	D D S K G K S K H P
421/141	451/151
GTT GAA GGT TTG TGC AAT TGA AGC GGG TGG	AAT GAT GTC AGT AGC AAT TGA TAA CCT TGG
L K V C A I E A G G	M M S V A I D N L G
481/161	511/171
GGC ACT CTG GAT GTG GGG AAA CAT CCC ACA	ACA AAG CAG TCC TGA AGA TGA TGC ATT CTC
A L W M W G N I P Q	Q S S P E D D A F S
541/181	571/191
ACT TGG AAG TGT TCC GAC CCC AGT CCC CAT	GTT TGA TTT TTA TGG TCA CAC AGT TGT TAA
L G S V P T P V P M	F D F Y G H T V V K
601/201	631/211
GGT AGC ATG TGG AAA CGA GCA TAT TGT TGC	TTT AGT TAG TGC TGG TGA AAA GCA CGT TGG
V A C G N E H I V A	L V S A G E K H V G
661/221	691/231
TGA TGA CCT TGT GTG TTA CAC TTG GGG GAA	CAA TAT GCA TGG TCA ACT GGG GTT GGG AGA
D D L V C Y T W G N	N M H G Q L G L G D
721/241	751/251
TAC AGA GAG TAG ATT ACA TCC TCA AGC TGT	TGC GCA GTT CAG CGA GGG ATC TGC TTG GAG
T E S R L H P Q A V	A Q F S E G S A W R
781/261	811/271
AGC TTA TGA GGT GGC ATG TGG AGC TTT TCA	TAC TGT TGT GCT TAG TCT TAA GAA GCG CCC
A Y E V A C G A F H	T V V L S L K K R P
841/281	871/291
AAG TGA TAC GTT AGA AAG TGT CTG TTG GAC	ATT TGG CCT TGG AGA AAA TGG TCA GCT CGG
S D T L E S V C W T	F G L G E N G Q L G
901/301	931/311
ACA TGG TAC CAC CCA GAG TGT CTC ACT CCC	TGA ACC TGC TAG AGA ATT ACC AGA AAA TGC
H G T T Q S V S L P	E P A R E L P E N A
961/321	991/331
GTA TTT TGT TTC TGT AGA TTG TGG ATT ATT	TCA TAC AAG TGT AGT TTC ATC TGC TGG GGA
Y F V S V D C G L F	H T S V V S S A G E
1021/341	1051/351
AGT GTG GTC ATG GGG AAT GGA AAA AGG TCT	AGG ACT TTG CCC AGA TGT GAG TTT TTC AGG
V W S W G M E K G L	G L C P D V S F S G
1081/361	1111/371
AAT TGA TCA CGG AGA TGC AAT CTT GCC ATT	GCA AAT CTT ATG TAA TAG GCC ACA GGG GCC
I D H G D A I L P L	Q I L C N R P Q G P
1141/381	1171/391
AAA ATT TCC TGA ACC TGT AGG AAT TGC ATG	TGG GGC AGC CCA CAC TGT CCT TGT TGC AGA
K F P E P V G I A C	G A A H T V L V A D
1201/401	1231/411
TGA TGG TTA TAA GCT TTG GTC TTG GGG ACG	AGG AAG GAG TGG AGT TCT TGG TGA CGG GAA
D G Y K L W S W G R	G R S G V L G D G K
1261/421	1291/431
GGG TAG TGA TTC TTA TTC TCC GTC AAT GGT	TTT ATG GCC CCC ACT ATC AGA AGA TTT CAA
G S D S Y S P S M V	L W P P L S E D F K
1321/441	1351/451
AGA CGG GCT GAA TTC TCC GGA CAC GGA GTC	AAA GAA GCC TGA AAA AAA AGC CGA GGT GAC
D G L N S P D T E S	K K P E K K A E V T
1381/461	1411/471
AGA GGT GGA TGA AAA GGT GTC TCC GAC ATT	GGA AGA GAT GAA ACG TTT GCA GTC AAA ACT
E V D E K V S P T L	E E M K R L Q S K L
1441/481	1471/491
TTC AGT GAT GGA GCG CTA TGT AAC CAT TCT	TCA TGG CTC ACT TTT TGG ACG GCC TTT TGA
S V M E R Y V T I L	H G S L F G R P F E
1501/501	1531/511
AGA AAG AGA GAT TCC AGC CTC ATT GCT CGA	GTC TGA TTC TTT CGA TGT TTC AGA AGC ATG
E R E I P A S L L E	S D S F D V S E A W

1561/521
GAA GAC TAT GTT AGA GGC AGC AGA CCG TAA AGA GCT AAG GCG TTT AGA GAT GTT CTA TGG
K T M L E A A D R K E L R R L E M F Y G

1621/541
AAA TAT GCT TGA TGG GGT CAA GGA TAA GAT AAT GAA GAG GAA GAT TCA AGA GAT TGT GAG
N M L D G V K D K I M K R K I Q E I V R

1681/561
GGA ATG CCT GCA GTC TTC AAG TAC TCC TAC TAC TCA ATA TTG ATT TTC TGA AAG TAG AAA
E C L Q S S S T P T T Q Y *

1741
AAG CTA GAC ATG GTA CAC ATT ACA CGT CTA TTA ATC TTT GTA TTT ATT TTC GAT GAT ATG

1801
GCC ATA CAA ATG CAG TAA TAA TTA CTC TAT ATA TAT GAT CAA TAA GGG GAT TTT GTA GGT

1861
TTG CCA TTT GCC AAC AAA ATT TTT GTA GCT TGT CTA TCA GTA CAG TGT GTA TAT TGT ATA

1921
TCA GAA AAC ATT TAA ATT ACA TTG TAG CCT TGC AAT TGT GCA TC

1591/531
AGA GCT AAG GCG TTT AGA GAT GTT CTA TGG
E L R R L E M F Y G

1651/551
AAT GAA GAG GAA GAT TCA AGA GAT TGT GAG
M K R K I Q E I V R

1711/571
TAC TCA ATA TTG ATT TTC TGA AAG TAG AAA
T Q Y *

1771
TTA ATC TTT GTA TTT ATT TTC GAT GAT ATG

1831
ATA TAT GAT CAA TAA GGG GAT TTT GTA GGT

1891
TGT CTA TCA GTA CAG TGT GTA TAT TGT ATA

1951
TGC AAT TGT GCA TC

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *BvMARB*:

1/1
CGG ACG CGT GGG CCT CCT CAG TCC TTC CCC CCC TCC TCT CAC AGC CTT CCT CTT TTT CTC

61/21
TTA AGA ACA GGT AAA AAT TTG AGG CTT GAG AAA TGT TGG TTT TAT TTG AAA CTC CTG CGG
M L V L F E T P A G

121/41
GTT TTG CCC TGT TTA AAG TAT TAG ATG AAG GAA AGC TTT CTC AAA TTG AGG ATT TGT GGA
F A L F K V L D E G K L S Q I E D L W K

181/61
AAG AGT TTA CTT CTG TTG ATT CAG CCA GAA AGG TAG TAA AGC TGA AAG CAT TCG ACA AGT
E F T S V D S A R K V V K L K A F D K F

241/81
TTG AAA ATA CAG CAG AAG CTT TAT CAG CAG CTA CTT TAT TGA TAG ACA GCA AAC CTA GCA
E N T A E A L S A A T L L I D S K P S K

301/101
AAG GAC TCA GAA AAT TTT TGA AAG CAC ACT GCA AGG GTG AAA CAT TAG CTG TTG CTG ATT
G L R K F L K A H C K G E T L A V A D S

361/121
CTA AAC TTG GAA ATG CAA TTA AGG AGA AAT TGC AAA TTG AGT GTG TTC ACA ATA ATT CTG
K L G N A I K E K L Q I E C V H N N S V

421/141
TGA TGG AGC TGA TGA GAG GGG TGA GAA GTC AGT TGA GTG AGC TCA TTT CTG GCC TTG GAG
M E L M R G V R S Q L S E L I S G L G A

481/161
CTC AAG ATT TGG CTC CAA TGA GCT TGG GTT TAT CTC ATA GCT TGT CGA GAT ATA AAT TAA
Q D L A P M S L G L S H S L S R Y K L K

541/181
AGT TCA GTC CTG AAA AGG TAG ATA CCA TGA TCA TTC AAG CCA TTG GTT TGT TGG ATG ACC
F S P E K V D T M I I Q A I G L L D D L

601/201
TTG ACA AAG AGC TTA ATA CAT ATG CAA TGA GAG TTC GTG AAT GGT ATG GCT GGC ATT TTC
D K E L N T Y A M R V R E W Y G W H F P

661/221
CTG AGC TTT CAA AGA TTG TAC AAG ACA ATA TAC TGT ATG CTA AGG CTG TGA AAT TGA TGG
E L S K I V Q D N I L Y A K A V K L M G

721/241
GAA ATC GTG TTA ATG CTG CAA AGC TGG ACT TCT CTG AGG TAT TGC CTG AGG AGG TTG AGA
N R V N A A K L D F S E V L P E E V E T

31/11
CCC TCC TCT CAC AGC CTT CCT CTT TTT CTC

91/31
AAA TGT TGG TTT TAT TTG AAA CTC CTG CGG
M L V L F E T P A G

151/51
GAA AGC TTT CTC AAA TTG AGG ATT TGT GGA
K L S Q I E D L W K

211/71
AGG TAG TAA AGC TGA AAG CAT TCG ACA AGT
V V K L K A F D K F

271/91
CTA CTT TAT TGA TAG ACA GCA AAC CTA GCA
T L L I D S K P S K

331/111
GCA AGG GTG AAA CAT TAG CTG TTG CTG ATT
K G E T L A V A D S

391/131
TGC AAA TTG AGT GTG TTC ACA ATA ATT CTG
Q I E C V H N N S V

451/151
AGT TGA GTG AGC TCA TTT CTG GCC TTG GAG
L S E L I S G L G A

511/171
TAT CTC ATA GCT TGT CGA GAT ATA AAT TAA
S H S L S R Y K L K

571/191
TCA TTC AAG CCA TTG GTT TGT TGG ATG ACC
I I Q A I G L L D D L

631/211
GAG TTC GTG AAT GGT ATG GCT GGC ATT TTC
V R E W Y G W H F P

691/231
TAC TGT ATG CTA AGG CTG TGA AAT TGA TGG
L Y A K A V K L M G

751/251
TCT CTG AGG TAT TGC CTG AGG AGG TTG AGA
S E V L P E E V E T

781/261
 CAG GGC TTA AAG AGG CTG CCA TGA TCT CCA TGG GAA CTG AAG TCA GCG ATC TTG ATT TGC
 G L K E A A M I S M G T E V S D L D L L

811/271
 841/281
 TGA ATA TCA AGG AAC TCT GTG ATC AAG TTT TGT CTC TAG CAG AAT ACA GAG CTC AGT TGT
 N I K E L C D Q V L S L A E Y R A Q L Y

901/301
 ATG ATT ATC TGA AAA GCA GAA TGA ACA CAA TTG CTC CAA ATT TGA CTG CTC TTG TGG GTG
 D Y L K S R M N T I A P N L T A L V G E

931/311
 961/321
 AAC TTG TTG GTG CTC GTC TAA TTG CTC ATG GTG GAA GTT TGA TAA ACC TTG CAA AGC AGC
 L V G A R L I A H G G S L I N L A K Q P

991/331
 1021/341
 CTG GGA GCA CAG TAC AAA TTC TTG GGG CAG AGA AGG CTC TTT TCA GAG CCT TGA AAA CAA
 G S T V Q I L G A E K A L F R A L K T K

1051/351
 1081/361
 AGC ATG CAA CCC CTA AAT ATG GGC TTA TCT ATC ACG CTT CCT TGA TTG GGC AGG CTG CCC
 H A T P K Y G L I Y H A S L I G Q A A P

1111/371
 1141/381
 CTA AAC ACA AGG GGA AAA TAT CTC GTT CCC TTG CAG CGA AAA CTG CAC TAG CAA TTC GTT
 K H K G K I S R S L A A K T A L A I R Y

1171/391
 1201/401
 ATG ATG CTC TTG GGG ATA ACC CAG ATA ACA CTA TGG GTC TTG AAA ATC GTG CCA AGC TTG
 D A L G D N P D N T M G L E N R A K L E

1231/411
 1261/421
 AAG CCC GTC TAA GAA ACC TTG AAG GTA AAG AAT TGG GTC GGT CTG CCG GGT CAG CTA AGG
 A R L R N L E G K E L G R S A G S A K G

1291/431
 1321/441
 GAA AAC CAC AAA TAG AAG TCT ATG ACA AAG ATC ATA AAA AGG GAG CAG GAG CAC TAA TTA
 K P Q I E V Y D K D H K K G A G A L I T

1351/451
 1381/461
 CCG CTG CAA AGA CTT ACA ATC CTG CTG CTG ATT CCA TCC TTG GTA AGA AGG ATG GCA ATT
 A A K T Y N P A A D S I L G K K D G N L

1411/471
 1441/481
 TGA TGC GAA TTG AAA CCA ATG TTG ATT TGG AAG AGG AAA CAA AAA AGG CAA AGA AAG AAA
 M R I E T N V D L E E E T K K A K K E K

1471/491
 1501/501
 AGA AGG AGA AAA AGA AGG GTT CTG TTG TGG AAA ATG GTG TAG CTA ACG GCG GGG ATG AAA
 K E K K K G S V V E N G V A N G G D E N

1531/511
 1561/521
 ATG TGG AAC CTG AAG ATG AAA AGA CAG CAA AGA AAG AGA AGA AAA AGA AGC AGC TTA
 V E P E D E K T A K K E K K K K K Q L T

1591/531
 1621/541
 CTG AAA ATG GAG ATA AAA TTG AAG AAC CAG AAA CAG GCA AAA AGG AGA AAA AGA AGA AGA
 E N G D K I E E P E T G K K E K K K K K

1651/551
 1681/561
 AGC AGG CTG AGA CTG AGG ATA ACG AGG AAG CAG GAG TGA AGG ATA AGA AAA AGA AAA GAA
 Q A E T E D N E E A G V K D K K K K R K

1711/571
 1741/581
 AGC ATG CAG ATG CTG ATG AGG AAG CTG AAC CTG TGA GTG AGA AGA AGG AAA AGA AAA AGA
 H A D A D E E A E P V S E K K E K K K K

1771/591
 1801/601
 AGA AAA AGT AGA GGT AGC TGT GGT GAA TTC GGG CAA ATC TAA CAG TTT TGG CCA TCT TCA
 K K *

1831/611
 1861
 GCA ATG GGA TGA TAT TTT TCC TCT GTA AAA TTT GCT GTT TGC ATT ATG TTA TAG GAT TAT

1891
 1921
 TCC TTG TTA GAG TTA GTA TTA GCT ATG TTC TCC GTC ATG TAT GTG CCA GAA TGT TTG TTA

1951
 1981
 AAG GAC CAT AGC AGC AAA TCT TTG TCT GAG ATA TGA TAC GCA TGT GAT TCT CGC C

2011

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *BvWDRP*:

```

1/1                               31/11
TTC CAT CAT CAT CAT CAA AAA CAA ACT TCA TCA AAC AAA CAA AAT CAT TTT TCT CTC TAT

61/21                             91/31
TAC AAA AAC TAC CAT TAT GTC TCC TAT TGA TAC CAA AAA CAA CAC TTC TTC ACG AAG AGT
                               M   S   P   I   D   T   K   N   N   T   S   S   R   R   V

121/41                             151/51
AAA ATT CAG ACA ACT ACT ACA ACA ACA ATC ATC TGA AGA AGA AAA TGA AGA TCA TAT AAT
K   F   R   Q   L   L   Q   Q   Q   S   S   E   E   E   N   E   D   H   I   I

181/61                             211/71
ACA ACA AAG TCC TAA TCA TTA TTA TTC AAG TAG TAG AGG TAG TAA CGC ATC TGC TGA AAC
Q   Q   S   P   N   H   Y   Y   S   S   S   R   G   S   N   A   S   A   E   T

241/81                             271/91
TTT ATC TAG TAA TAG TAC TAG TCC AAG ATT AAG CAG TTT TAA TTA TAG TAC AGA TCA TGA
L   S   S   N   S   T   S   P   R   L   S   S   F   N   Y   S   T   D   H   D

301/101                             331/111
TAA TAT CTT TTC CTC TAC TAC ATC ACC TTC ACC TCT ATC TTT TAA TCA AAT TTC ATC TTT
N   I   F   S   S   T   T   S   P   S   P   L   S   F   N   Q   I   S   S   L

361/121                             391/131
GTC ACC TTA TCT TAA ATC TCC ATG GAT TAA ACT ATC TCC ATT TTT ATA CCC TAC TAC ACC
S   P   Y   L   K   S   P   W   I   K   L   S   P   F   L   Y   P   T   T   P

421/141                             451/151
AAA TTA CTC TAC TAG TAG TAA TGT TTA CAT TTC TAG AGG TAG AAA ATG TCT TAT TGG TTC
N   Y   S   T   S   S   N   V   Y   I   S   R   G   R   K   C   L   I   G   S

481/161                             511/171
TCT TTT TAG AGA AGA AGG ACA TGT GTA TTC GTT GGC AGC TAA AGA TGG GAT GTT GTA TAC
L   F   R   E   E   G   H   V   Y   S   L   A   A   K   D   G   M   L   Y   T

541/181                             571/191
CGG GTC GGA GTC GAA AAA TAT TCG GGT TTG GAG GAA TTT TAA TGA TGC GGG TGG GTT TAA
G   S   E   S   K   N   I   R   V   W   R   N   F   N   D   A   G   G   F   K

601/201                             631/211
GTC TGG AAG TGG GTT GGT TAA AGC GAT TGT TAT ATC GAA AAA TGA GCA AGT TTT TAC GGG
S   G   S   G   L   V   K   A   I   V   I   S   K   N   E   Q   V   F   T   G

661/221                             691/231
TCA TCA AGA TGG GAA GAT TCG GAT ATG GAA TCC GAG AGG AAA ACG GGT GGG TAC GTT ACC
H   Q   D   G   K   I   R   I   W   N   P   R   G   K   R   V   G   T   L   P

721/241                             751/251
GAA GTT TGG TGA TTA TGT AAG AAG TTC TAT GAA TCC AAA GAA TTA TGT GGA GGT AAG AAG
K   F   G   D   Y   V   R   S   S   M   N   P   K   N   Y   V   E   V   R   R

781/261                             811/271
ACA TAG GAA GGT TCC TAA GAT AAA GCA TTT TGA TGC TGT TTC GTG TAT GAG TTT GAA TGA
H   R   K   V   P   K   I   K   H   F   D   A   V   S   C   M   S   L   N   E

841/281                             871/291
GGA GTT TGG GTT GTT GTA TTC AGG TTC GTG GGA TAA GAG TAT AAA AGT GTG GAG GAT ATC
E   F   G   L   L   Y   S   G   S   W   D   K   S   I   K   V   W   R   I   S

901/301                             931/311
AGA TGG GAA ATG TTT AGA GTC ATT TGA AGC TCA TGA TGA TGC TAT TAA CTC TAT TGT GGT
D   G   K   C   L   E   S   F   E   A   H   D   D   A   I   N   S   I   V   V

961/321                             991/331
GGG CTT TGA TGG GTT GGT GTT TTC GGG CTC GGC CGA CGG GTC GGT GAA GGT GTG GAG GCG
G   F   D   G   L   V   F   S   G   S   A   D   G   S   V   K   V   W   R   R

1021/341                             1051/351
GGA GTT GGA TGG GAG GAA TGT AAG GCA TTT TCA TAT GAG GAC TTT GTT AAA TCA AGA AAA
E   L   D   G   R   N   V   R   H   F   H   M   R   T   L   L   N   Q   E   N

1081/361                             1111/371
TGC CGT TAC GGC GTT GGC GGT GGT TGA CAC GGC GGC GCA GAC GGC GGC GGT GGT GGA GGC
A   V   T   A   L   A   V   V   D   T   A   A   Q   T   A   A   V   V   E   A

```



```

1141/381                               1171/391
GGC GGC GGA GGT GGT GGC GGA GGG GAT AGA AGG TGG TGG TGG TGG TGG GTG GAT GTT GTA
A A E V V A E G I E G G G G G G W M L Y

1201/401                               1231/411
TGC GGG GTC GTC GGA TGG GTT GGT GAA TTT TTG GGA GAG GGA TGA GGA GGA GGG GGT GGT
A G S S D G L V N F W E R D E E E G V V

1261/421                               1291/431
GTA CGG AGG GGT GTT GAG AGG GCA TAA GTT GGC AGT GTT GTG TTT GGT TAC GGC GGG GAA
Y G G V L R G H K L A V L C L V T A G N

1321/441                               1351/451
TTT GGT GTT GAG TGG GTC AGC AGA TAA AAC AAT TTG TGT GTG GAA GAG AGA AGG AGA TGG
L V L S G S A D K T I C V W K R E G D G

1381/461                               1411/471
GGT CCA CTC TTG TTT AGC TGT TTT ATC TGG TCA TTG TGG GCC CGT TAA GTG TTT AGC CGT
V H S C L A V L S G H C G P V K C L A V

1441/481                               1471/491
TGA GCA AGA TCA TGA TCA CGA CGA CGA CGG TGA CGA TGA TGA GAA GGA TCG GCG GGG GCG
E Q D H D H D D D G D D E K D R R G R

1501/501                               1531/511
CGA GTG GGT GGT GTA TAG TGG TAG TTT GGA CAA GTC CGT TAG GAT ATG GCG GGT ATC CGC
E W V V Y S G S L D K S V R I W R V S A

1561/521                               1591/531
GGA GGT GTT AGA TGA TAA AGG GTA CTA ATT ATG ATC AAA AGA AAA AGT CAG TGT AGT ATA
E V L D D K G Y *

1621                                   1651
CGC GCC ACT GTA CGT GGC GAG GTG GAT TTT TGT TTT TCG AGA AGG CGA GTG AAA AAG GCG

1681                                   1711
GAG GTG TTG GTA CGT GGA AGT ATC GGA AAG CGA TGG TGA CCG ACC CCC CTT CTT TGC AAG

1741                                   1771
TGC GGA GAA CGT TGG GAA TCA TGG AGA GCC AAA GGA AAA ATA TAT GGT TAT TTG GTC CCC

1801                                   1831
TTT AGC AAA GTT ACA AAA GTT ACA ATT TAA TTT TTG AGA GGG ATT TGA AAA CAT GCA ACA

1861                                   1891
AAA ATT GTA TAG TAA TCC AAA TTA AGA ATT TTC TGC C +

```

+ Die Bindungsstelle für den zweiten RT-PCR-Primer SSH-333-Right (Tabelle 1, Kapitel 2.7) liegt nur im zugehörigen SSH-Fragment vor, der hier angegebene cDNA-Klon wird 110bp früher polyadenyliert.

Nukleotidsequenz *BvNPCG1*:

```

1                                   31
ACA ATT CAT AAA ATT AAA TCA ACT AAA AGA AAG TGA AAA CAG AAT TTC AAT TCC TCT GTT

61                                   91
CTT CTG TTT CGG CCA CCA CCA CAA CCA CCA CAC AGC CAC CAC CTC CCC ACT TTC CGA CCA

121                                   151
CCT TTG GCG AAC CCA CAC CCA GCC GAC CAA CCG CCG ACC GTC GCC CTC CTC TCT CGC CGC

181                                   211
ACC TTC GTC TCC TTC GAC CCC CCC CTG CAC ACT CGT CTC TCT CTC TCC TCC GCG ACA CCT

241                                   271
CCG CAC CAC CGC ACA TCA GCC CCT TAC CTT TCT GCC CGT CAC TAT TGC CTC GCC CGT CGT

301                                   331
CGC CGC CGC CGC GAA CTG ACG CCA CCA GCA GGC CTC CGT CGC TGA CCA CAT TCT TTC TCT

361                                   391
CGC TCC TGC GTG TGT GTG TCT GGT GTA GAA CTC GTT CCT CGG AGC TCA GTA AGG ACG ATA

421                                   451
TCA CGG ACA TAA GAA GAG GAT TAT TAT TAT CAT TCT GCA ATC AAG GTC TCT CTC CCT CAC

```

```

481                               511
TCC GTC ACA ATC CGC CAA CAA CTG TTG CAT GTC CGT CAC CAC TAA CGA CTC CTC TCC TTC
541                               571
ACT GCC GCA GTG CCG CCC ACC TCG CCA GCA ACG TCT TTA TTT GTC ATT CCA TTA TTG CAA
601                               631
GTA TAG GCG AGA TGA AAA CTA GCT CTA CAT ATT TTC TGA TGG TGT TTA TCC TAG ATG GCT
661                               691
AAC TGC ATC ACA CCA TGT AGA TTT TGA CAC AAT GGC TGG TGC AGA TAA GTT TGG GAA TGT
721                               751
ATA TTT TGT ACA TTA GCC TGT GTT TTT TGG AAA AAA AAA GGA ATA GCT TAT TTG GAA AGA
781                               811
ACG TCC TTC AAT TGA TGT GTT GTC AAG TTG TTG TTT ATA TTG TGT AGA TTG CTT AAT GTT
841                               871
CTC TTT GTG CCT TTG TTT TTT AGA TAT AAA TGG AGA TCC ATG CGG ACC ATG CTG ATT GAA
901                               931
CTT CAC TTT TAA GCC TTG CTA CAT GTT TTT CCT TGA AAG CAT GGA TGT TTT CAT TTG AAG
961                               991
CTT ATA GTT TAA TTT TAA GTG CCA AAC TTT CAT ATG ATG TTG TTG ATG GTG TTT CCA CTG
1021                               1051
TAC TGT AAA TAT TTT TAG GAG GTT TAG TGA TAA TGA AAT TTA AAG CAA GAT AGA AGA TAC
1081                               1111
ATA TGA CAT CAT GAT TGT ATA ATT ATG ATG AGA GAT GCA TCT TTC TTT TGT TTA GAT CTA
1141                               1171
TAA TTC TTA CCT GTT TTT CAC AAA ACT TTT TGT AGA ATA CTA ATT ATG GTG TCA TAA ACG
1201                               1231
CAT ATG AGA TTT TTT TTG CAA TTA TTA GCT AGT TGT TTA TAC TTG TGT CAT GAC ATA TTA
1261                               1291
ATT TTT TAT TTC ATT AAT AAA ATT TCA CTT TAT ATC C

```

Nukleotidsequenz *BvNPCG2*:

```

1                               31
ATT AAA TCT CCC CCT TCT CGA ATT CTC CTT TCT CTC TCT TAT CAT GGC TTC TTC GCG GTT
61                               91
TAG ATG TCT CTC AAG ATT ATC ATT CAA TTC AAA TTT CTT CTT CAT ATT TGA ATA GAT CGT
121                               151
TCA AAG ATC CAT ATA TAA CAT GAT CAT TGA TTT GCG ACG GTT CTT TTT ATC GGT GAT TAA
181                               211
ATT TCG GTT GAT TTT TTT GAA GAC ATG GTG GAT CCT TCA TTG GAG AAG ACC GAT CTG CGT
241                               271
AAC AGT TAA TTG GAT CTG CTT GAT TCG AGG GTT CGG GAG TGC CTT TTG CTT GTG GTT CTG
301                               331
ATT AAT GGT GTC GGA TGA ATG GTA TCT TGG CGA AGT TGT TGG TTA ACC AAA GAA GAT TGA
361                               391
AAG CTA TGC TGT TTG GCT CTA CGG TAT CTA ATA TTT TTT TAG TGT TTG GTA ATT AGC AAG
421                               451
TTA TGT GAT TCA TAG TGG GAG CAT AAG TAG GCA GAT ACA CTT TTT TTT TTT TAG TTG TTT
481                               511
CGA TTA GTT GCT CTT GTT AGT TGT CGA CCT TTG CCA TGT CAG GTG CGC TTG CTT GGC AGG
541                               571
TCA CCC GAT TTA ATA AAA GTT TTC ATT TGT TGG GTT TTA AGG GGA GAT GGT ACG GGG TTG
601                               631
TTT TTG CCC GAC TCT CCC CTT TTG TGT CTG TGT CTC TCG CAA ATT TCT TTA CCC CCT TCC
661                               691
CCC TCC CCC TCC CAT TCT ACG GTA AAA GCT ATT AAT TGC TAC TAC TAC CAC TAT TGT TGA

```

```

721      751
GCA AAT CAA CAT GCA AAT CGT CTC GTT GGA CAA CAA TGC GGA ATT GCT AAG GTA TCT CAA
781      811
TGA CCC CTT TTA ATT CCT TGT TAG GCA TTC ATT GAT GTG CAA ACT TCC CTT TAA ATT TTC
841      871
ATT CAT CTG CTT TAG TGG CCC TCT CCG GTC CAG ATA TAG TCA GAT TAA TCA TCA GGA TGT
901      931
TTT AAT GGG GAT TAA AAT TTG ATA CAT ATG CAA CTT TCT TGA ATA TTA AAA TTT GAT ACA
961      991
TAT GCA ACT TTC TTG AAT ATA TTC TTG TTT GAC GCT TAC TCA TAT ATC AAT ATC GCA GTA
1021     1051
CAT AAT TTA ATG TGG GGA ACA GTA GTC CAT ATA GCA ACC CAA TCC TGA TTA AGC TAC ATC
1081     1111
CAC GTG TGA ATG ATG CAA TTG CAC AAT GCA AAT ATC AGC TGA TAA CAT GTG TAT AAC TCA
1141     1171
ATC TTG GAT CTT CAA CGA AAT TTC ATA TCC TAT TAT GAG AAA GTA GTC ATT ATT TTA TGG
1201     1231
ATT TAC TGT CAA TAT AAT CTA TGC TTC ATG ATG CTT GTG ATT CAC TCT TGT TTC TCT ATA
1261     1291
TAG AGG TGT CAG GAA GAA GTA TTA TTA TGA TTG TAC TAT TTT GCT CTG TAT TAG AAT TAT
1321     1351
ATC TGC AGG AGT TGT ACT CCA CAT CCT CGA TTG CTG AAG ATC AAA TAT TCT TGG TGC TAT
1381     1411
TTC TTT GGA AGA GAG ATT TGT TTG CCC CTG TTA TGC GAT GTC GCT GGA GAC TGC ATT TAT
1441     1471
GAA ATA AAA TTA TTT TCG CAA TTT TGG TGA CGA TGA GAA CTT TAC ATA TAT GTT GAG ATG
1501     1531
GTT TGT GAG TAA GAA GGC AGG GGC AGG AGA AAC TGC AAA CTG GAG GTA GTT TAT GTC CAA
1561     1591
CAT CAC GGT TGA TTG TTC AGT TGA AAT CTT CCT GGT GGA ATT TTG GCC TGC AAA ATT ATC
1621     1651
CCT GTT GTG AAA TAC ATT CTG ATG GCA TCC GTC CAA TTT AAG GCT GAT ATG ATC TGA TTG
1681     1711
AGC TAT GCA TAT CTG GTG TTG TGG AAT TGG ATT GCT GGT TGA TGC TTG TCA GCT ACT TAA
1741     1771
GAC GAG CAA GAA CAG CTG TAC CTT TAC GTG ACA CCT TTA CAG AAA CAA TGC ATT ACA TAA
1801     1831
CAT CTG GAG AAC AAA GCT GTT AAG TTT GTC TGG TGC TCT GTA CAA TAT CTT GGT GCC TTT
1861     1891
TTT GGA ATG TTG TGA ACG CCA ATT TAG TTA CAT CTG GAG AAT GAA GTT GTG ACA TTT TGC
1921     1951
TGG TGT TGT GTA CGA TAT GTG GTG CTC TAT TGG AAT TTT AAA ACA TCT GGC TTG ATA ACA
1981     2011
TCT GGA GAA AAG TTA CGT TTG GTT GGT GTT GTG TAC TAT ATA TTG GTA TTG TGA TGA CAA
2041     2071
GCT ATG TTT TGG CTG TGA TGC GTG GGC AAA TTT GTA GTC ATC TTT ATA TCC AAG CTG TGG
2101     2131
ACT AGT TGC CTT ATG TCA TTT GGC GAG GTC TGG AGA TTT TGA GCA TTT TCT TAG TAT TGT
2161     2191
ACT TTG CTG TGC ATT TGT TCT ATT TTT GTT CTT TTT TTA TTT GAA ATC TGC ATC ATT TGG
2221     2251
TAG CAT CTT TGC TAG ACT TGT ATC TAT TTT CTA TGT ATG ATA CTG TTA GGT CTT GAT GTT
2281     2311
AAG GTT TTA ACA CCT GAC ATG GCT GTG AAA GTA TTT TCT ATG TTG CAT TAT TGC TGC ATT
2341
GCG AAG CTC AAT TTT T

```

Nukleotidsequenz *BvNPCG3*:

```

1                               31
AAA CGC TCA CGG TGT CGG TGC CGG TGC CGG TGC CGG TGC CCA ACT CAT AAG CAA ATT GAA
61                               91
TTC CTT TAG AAC CTC TGG AAT CTG GAA CCT CTC ATA TGT CGT ACG CAA AGC TCG AAT TGC
121                               151
AGA AGC TCG TTC CAG ATG TTA TGC CCC TTG ATG TTT GAG AAT AAA GGC TGG ATG GAG AAC
181                               211
TGT AGC CGG ATA TTG CTA ATG CAC CGT TCT TGA CAT TTG TCA ATA GTT CCT GAC TTT CAC
241                               271
TTC ATC AGC ATA TTC TCA GTA TAG TCT TCT GCT TGC AGA TAA TCC CTA AGT TCT TGG TTT
301                               331
TCT TGT TTG GAA GTC TGT TCT AAT TCA TAG GGT TTC ATT TGT TTC ATG TTT TGG GCT TCC
361                               391
TTG TCG AGT TGT AGT CTC CTC TGT GAG AGT TGC TTG GGG CTT AAT AAG CTG GCA TAA CGT
421                               451
CAC AAA CTA GAG CCA CTG CTT AAA GGA AAA TGG TAT ACC AAG GGA AAG GAA AGC CAA AAC
481                               511
AGC ACC AAA ACT ACT TCT TCC AGT CAG GCT GCT AAA CTA CCT CAG GAA AGG CTA TTT TTG
541                               571
CTG CGG CCC TTT CTC CGG AGT TTA CCA CGC GAA CAA TGT GGG TCA ACT GCT TTT GGC TTT
601                               631
AGC TAT TTT ATT ATT TCT CTT ACT GCA GTT CTG CAG CTG TCG CTG ACT GAG ATT TGA TTA
661                               691
CTT AAG AGG GGT GTT TCT CGT TTG TTC CTA TTT TAG AAC TAA TTT CTC ATA GAT TCT TAG
721                               751
ATC CCT TGT TTT CTG CTT TGT ACA GAT CTT CTG CTT CAG GTG TTT GAT GGT GTT AGT TGT
781
CTT GT

```

GT: Spleiß-Donorstelle**AG**: Spleiß-Akzeptorstelle

7.3 Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests zur Bestimmung der T-DNA-Loci Anzahl transgener *Arabidopsis* Linien

χ^2 - Werte der Segregationsanalysen transgener *A. thaliana* Linien. Die Bewertung erfolgte für ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ (95% Aussagewahrscheinlichkeit) bei $\chi^2_{\text{kritisch}} = 3,841$. Bestätigung der Hypothese bei $\chi^2 \leq \chi^2_{\text{kritisch}}$. Bei Bestätigung beider Hypothesen gilt die Hypothese mit kleinerem χ^2 als wahrscheinlicher.

Linie	Hygromycin resistente Pflanzen	Hygromycin sensitive Pflanzen	χ^2 - Wert		Bewertung T-DNA-Loci
			Hypothese 1: 1 T-DNA-Locus	Hypothese 2: 2 T-DNA-Loci	
PSK-2	78	19	1,477	10,125	1
PSK-3	39	11	0,117	6,339	1
PSK-5	128	30	3,333	15,847	1
PSK-7	138	7	124,070	0,366	2
CPRX1-1	43	9	1,646	3,703	1
CPRX1-2	64	16	0,957	8,613	1
CPRX1-4	44	10	1,105	4,604	1
CPRX1-5	96	1	522,954	21,033	>2
CPRX1-6	88	7	40,724	0,049	2
CPRX1-7	71	16	2,111	7,754	1
CPRX1-8	68	30	1,201	26,248	1
CPRX1-9	10	38	82,137	150,347	ungeklärt
CPRX1-10	97	2	252,635	6,939	>2
CPRX1-11	73	24	0,003	16,835	1
CPRX1-12	88	10	21,827	1,269	2
CPRX1-13	77	21	0,545	12,524	1
CPRX1-14	56	15	0,428	8,558	1
BPM1-1	52	30	4,258	31,230	ungeklärt
BPM1-2	48	12	0,651	6,257	1
BPM1-3	73	12	7,429	3,715	2
BPM1-4	51	19	0,072	14,413	1
BPM1-5	75	7	26,396	0,295	2
BPM1-6	67	15	2,040	7,171	1
BPM1-7	60	26	0,882	22,328	1
BPM1-8	67	12	5,165	4,232	ungeklärt
BPM1-9	57	17	0,076	10,769	1

7.4 Klassenzuordnung der quantifizierten Blattgrößen von vier *BvPSK*-cDNA überexprimierenden *A. thaliana* Linien und dem Wildtyp

Klassen [Pixel]	Anzahl Pflanzen je Klasse []				
	Wildtyp	PSK-2	PSK-3	PSK-5	PSK-7
0-2000	0	11	0	0	1
2001-2750	10	11	0	1	6
2751-3500	13	27	1	1	9
3501-4250	21	37	17	11	9
4251-5000	25	26	17	14	3
5001-5750	18	15	31	19	8
5751-6500	8	2	25	28	18
6501-7250	5	0	20	18	12
7251-8000	0	0	8	11	18
8001-8750	0	0	2	5	15
8751-9500	0	0	1	2	9
	Σ100	Σ129	Σ122	Σ110	Σ108

7.5 Peroxidaseaktivitätsmessungen von transgenen Überexpressionslinien des Nach-Ernte induzierten Peroxidase Gens *BvCPRX1*

Linie	Peroxidaseaktivität U [mmol/l x min]				Stabw.	Konz. c [mg/ml]	Spezifische Aktivität U [mmol/g x min]
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittel- wert			
CPRX1-1	2,48	2,03	-	2,26	0,32	2,30	0,98
CPRX1-2	2,37	2,14	-	2,26	0,16	2,23	1,01
CPRX1-4	2,12	-	-	2,12	-	1,71	1,24
CPRX1-5	5,75	5,19	6,54	5,83	0,68	1,38	4,23
CPRX1-6	8,12	8,35	9,48	8,65	0,73	2,05	4,22
CPRX1-7	9,48	9,48	9,48	9,48	0,00	3,14	3,02
CPRX1-8	8,35	7,67	8,57	8,20	0,47	2,76	2,97
CPRX1-10	8,69		9,93	9,31	0,88	2,12	4,39
CPRX1-11	8,69	8,35	11,51	9,52	1,73	2,87	3,32
CPRX1-12	8,46	8,57	9,25	8,76	0,43	2,96	2,96
CPRX1-13	9,36	7,62	9,93	8,97	1,20	2,05	4,38
CPRX1-14	10,02	9,45	9,48	9,65	0,32	2,53	3,81
Wt	9,93	9,93	-	9,93	0,00	5,96	1,67
ctrl (pVKH)	9,31	9,88	9,70	9,63	0,29	2,73	3,52

7.6 Quantifizierte Blattgrößen transgener Pflanzen von zwei Überexpressionslinien des Nach-Ernte induzierten Gens *BvBPM1* und von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp unter mannitolvermitteltem Trockenstress

Linie	0mM Mannitol		50mM Mannitol		100mM Mannitol		200mM Mannitol	
	Mittel-wert [Pixel]	Stabw. [Pixel]	Mittel-wert [Pixel]	Stabw. [Pixel]	Mittel-wert [Pixel]	Stabw. [Pixel]	Mittel-wert [Pixel]	Stabw. [Pixel]
BPM1-3	574,39	178,63	386,23	110,52	275,82	75,31	187,37	67,19
BPM1-5	465,67	131,49	332,28	63,71	255,28	61,27	157,82	40,33
Wt	457,32	161,36	308,30	88,25	196,50	51,41	145,07	43,67

7.7 DNA- / Glycerinkultur- / Samenverzeichnis

DNA- / Glycerinkulturverzeichnis (*E. coli*-Stämme, wenn nicht anders vermerkt):

DNA-Nr.	Glycerin-Nr.	Name	Beschreibung	Kapitel
3578		pVKH-35S-pA1	T-DNA-Vektor	2.19
3984		p1xW1-luc-kann	T-DNA-Vektor	2.18
	2412	XL1-Blue MRF'	<i>E. coli</i> -Stamm	2.5
	2878	INV α F'	<i>E. coli</i> -Stamm	2.5
	2680	XL1-Blue MRA	<i>E. coli</i> -Stamm	2.5
	2546	C58C1	<i>A. tumefaciens</i> -Stamm	2.19
	2812	GV3101	<i>A. tumefaciens</i> -Stamm	2.18
	1250	EMBL 3 SP6/T7 1K0088	Genomische Lambda-Bank Zuckerrübe	2.17
3499		145.3r1	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3500		153.6r1	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3501		220.1r1	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3502		220.1r2	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3503		254.5r1	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3504		266.1r1	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3505		288.2r1	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3506		288.2r2	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3507		292.7r1	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3508		292.7r2	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3509		296.8r1	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3510		296.8r2	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3511		296.8r3	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3512		333.1r1	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3513		333.1r2	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3514		333.1r3RC	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3771		333.1r4RC	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3772		333.1r5RC	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3515		334.6r1	Primer zur cDNA Sequenzierung	2.7, Tabelle 2
3517		193.1RACE5'	Primer für 5' RACE-PCR <i>BvGLP-r</i>	2.7, Tabelle 3
4369		132.1-5'	Oligo <i>BvPSK</i>	2.7, Tabelle 4
4370		7-G2-5'	Oligo <i>BvHSP83</i>	2.7, Tabelle 5
4371		20.3-5'	Oligo <i>CPRX1</i>	2.7, Tabelle 5
4372		153.6-5'	Oligo <i>RIP-r1</i>	2.7, Tabelle 5
4373		227.5-5'	Oligo <i>NPCG2</i>	2.7, Tabelle 5
4374		7- <i>Nco</i> I-Primer	Primer <i>BvHSP83</i> Prom/LUC Konstrukte	2.7, Tabelle 6
4375		7- <i>Mlu</i> I-Primer	"	2.7, Tabelle 6
4376		20- <i>Nco</i> I-Primer	Primer <i>BvCPRX1</i> Prom/LUC Konstrukte	2.7, Tabelle 6
4377		20- <i>Sna</i> BI-Primer	"	2.7, Tabelle 6
4378		153- <i>Nco</i> I-Primer	Primer <i>BvRIP-r1</i> Prom/LUC Konstrukte	2.7, Tabelle 6
4379		153- <i>Bsp</i> 120I-Primer	"	2.7, Tabelle 6
4380		227- <i>Nco</i> I-Primer	Primer <i>BvNPCG2</i> Prom/LUC Konstrukte	2.7, Tabelle 6
4381		227- <i>Pag</i> I-Primer	"	2.7, Tabelle 6
4382		pCR [®] 2.1-P- <i>HSP83</i>	Promotorfragment von <i>BvHSP83</i> XhoI/EcoRI	2.17, Tabelle 11

DNA-Nr.	Glycerin-Nr.	Name	Beschreibung	Kapitel
4383	2782	pCR [®] 2.1-P- <i>CPRX1</i>	Promotorfragment von <i>BvCPRX1</i> BclI/BclI	2.17, Tabelle 11
4384	2792	pCR [®] 2.1-P- <i>RIP-r1</i>	Promotorfragment von <i>BvRIP-r1</i> BamHI/BamHI	2.17, Tabelle 11
4385	2784	pBSK-P- <i>NPCG2</i>	Promotorfragment von <i>BvNPCG3</i> XhoI/DraI in EcoRV	2.17, Tabelle 11
4386		pCMVSPORT6-LUC	Luciferase-Gen in pCMVSPORT6	2.18
4387		pBKS- <i>HSP83</i> -PCR::LUC	Luciferase-Gen gekoppelt an <i>BvHSP83</i> -PCR-Fragment in pBKS	2.18
4388		pBKS- <i>RIP-r1</i> -PCR::LUC	Luciferase-Gen gekoppelt an <i>BvRIP-r1</i> -PCR-Fragment in pBKS	2.18
4389		pBKS- <i>NPCG2</i> -PCR::LUC	Luciferase-Gen gekoppelt an <i>BvNPCG2</i> -PCR-Fragment in pBKS	2.18
4390	2813 A	pKan-P- <i>HSP83</i> ::LUC	Promotor-LUC-Konstrukt <i>BvHSP83</i> in T-DNA-Vektor (Kanamycin)	2.18, Tabelle 12
4391	2814 A	pKan-P- <i>CPRX1</i> ::LUC	Promotor-LUC-Konstrukt <i>BvCPRX1</i> in T-DNA-Vektor (Kanamycin)	2.18, Tabelle 12
4392	2815 A	pKan-P- <i>RIP-r1</i> ::LUC	Promotor-LUC-Konstrukt <i>BvRIP-r1</i> in T-DNA-Vektor (Kanamycin)	2.18, Tabelle 12
4393	2816 A	pKan-P- <i>NPCG2</i> ::LUC	Promotor-LUC-Konstrukt <i>BvNPCG2</i> in T-DNA-Vektor (Kanamycin)	2.18, Tabelle 12
4394	2885	<i>BvHSP83</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4395	2497	<i>BvCPRX1</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4396	2488	<i>BvRIP-r1</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4397	2513	<i>BvRIP-r2</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4398	2480	<i>BvB12D</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4399	2531	<i>BvGLP-r</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4400	2591	<i>BvSP2</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4401	2498	<i>BvC561R</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4402	2612	<i>BvBPM1</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4403	2530	<i>BvPSK</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4404	2506	<i>BvRCC</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4405	2600	<i>BvMARB</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4406	2539	<i>BvWDRP</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4407	2522	<i>BvNPCG1</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4408		<i>BvNPCG2</i>	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4409	2606	<i>BvNPCG3</i> 334.6	cDNA-Klon in pSPORT1	3.1.1, Tabelle 16
4410	2604	<i>BvNPCG3</i> 334.4	cDNA-Klon in pSPORT1	-
	2602	<i>BvNPCG3</i> 334.1	cDNA-Klon in pSPORT1	-
	2603	<i>BvNPCG3</i> 334.3	cDNA-Klon in pSPORT1	-
	2605	<i>BvNPCG3</i> 334.5	cDNA-Klon in pSPORT1	-
	2607	<i>BvNPCG3</i> 334.7	cDNA-Klon in pSPORT1	-
	2608	<i>BvNPCG3</i> 334.8	cDNA-Klon in pSPORT1	-
4411		5'-RACE-SSH193-22	5'-RACE-Produkt <i>BvGLP-r</i> in pCR2.1	3.1.1, Tabelle 16
	2886	pVKH- <i>CPRX1</i>	<i>BvCPRX1</i> -cDNA in pVKH-T-DNA- Vektor	2.19
4412	2887	pVKH- <i>PSK</i>	<i>BvPSK</i> -cDNA in pVKH-T-DNA- Vektor	2.19
4413	2889	pVKH- <i>BPM1</i>	<i>BvBPM1</i> -cDNA in pVKH-T-DNA- Vektor	2.19
4414	2892	pVKH- <i>NPCG3</i>	<i>BvNPCG3</i> -cDNA in pVKH-T-DNA- Vektor	2.19

* im Falle der Glycerinkulturen 2813-2816 steht das A für *A. tumefaciens* (GV3101)

Samenverzeichnis:

Samen-Nr.	Pflanzenlinien	Beschreibung	Kapitel
4012	PSK-2	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i> , homozygot	3.5.1
4013	PSK-3	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i> , homozygot	3.5.1
4014	PSK-5	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i> , homozygot	3.5.1
4015	PSK-7	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i> , homozygot	3.5.1
4016	CPRX1-1	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i> , homozygot	3.5.2
4017	CPRX1-2	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i> , homozygot	3.5.2
4018	CPRX1-4	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i> , homozygot	3.5.2
4019	CPRX1-5	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4020	CPRX1-6	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4021	CPRX1-7	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4022	CPRX1-8	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4023	CPRX1-9	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4024	CPRX1-10	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4025	CPRX1-11	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4026	CPRX1-12	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4027	CPRX1-13	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4028	CPRX1-14	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4052	NPCG3-1	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4053	NPCG3-2	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4054	NPCG3-3	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4055	NPCG3-4	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4056	NPCG3-5	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4057	BPM1-1	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i> , homozygot	3.5.2
4058	BPM1-2	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4059	BPM1-3	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i> , homozygot	3.5.2
4060	BPM1-4	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4061	BPM1-5	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i> , homozygot	3.5.2
4062	BPM1-6	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4063	BPM1-7	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4064	BPM1-8	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2
4065	BPM1-9	pVKH-cDNA in <i>A.t.</i>	3.5.2

Danksagung

Das größte "Danke Schön" richte an meinen Doktorvater und Mentor Herrn Prof. Dr. Reinhard Hehl für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung in den zurückliegenden Jahren. Die stets "offene Tür" hat vieles erleichtert, Danke dafür!

Herrn Prof. Dr. Ralf Rainer Mendel danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und für die Übernahme des Koreferats. Außerdem sage ich "Danke", für die Möglichkeit die Einrichtungen seines Instituts zu nutzen.

Ich bedanke mich bei der KWS Saat AG und der PLANTA GmbH in Einbeck für die Unterstützung während des Kooperationsprojekts, in dessen Rahmen diese Dissertation entstanden ist. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Dietmar Stahl für das zur Verfügung gestellte Material und die ständige Bereitschaft, Fragen zu beantworten.

Frau Elke Faurie danke ich dafür, dass erst durch sie sich so manches DNA-Fragment in einem Vektor "wiederfand" und unzählige Arabidopsis-Pflanzen das Licht der Welt erblickten. Die nicht gerade rauchfreien Nichtraucher-Pausen werden mir fehlen. Bei Herrn Ralph Lisson möchte ich mich für die langen Jahre der Teamarbeit und die fortwährenden Jahre der Freundschaft bedanken. Frau Jeannette Kappler danke ich für Ihre Untersuchungen am Gen *BvNPG3*. Allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik und insbesondere denen der AG Hehl danke ich für die von Unterstützung und Fröhlichkeit geprägten Jahre.

Carina, Dir danke ich für das WIR-Gefühl in mir, und dass es Dich für mich gibt.

Ein ganz besonderes "Danke Schön" richte ich an meine Eltern Karin und Franz-Josef Rotthues für die stetige Unterstützung in allen Bereichen des Lebens. Danke!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Alexander Rotthues
Geburtsdatum	26. Mai 1976
Geburtsort	Hildesheim
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1982-1986	Grundschule Holle
1986-1988	Orientierungsstufe Ambergaschule Bockenem
1988-1995	Goethegymnasium Hildesheim
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

07/1995 bis 06/1996	2. Kompanie Panzeraufklärungsbataillon 3, Lüneburg
---------------------	--

Studium

10/1996 bis 04/2002	Studium der Biotechnologie an der TU Braunschweig, Abschluss: Diplom
09/1998	Vordiplom
10/2001 bis 04/2002	Diplomarbeit, Institut für Genetik (Prof. Hehl), TU Braunschweig „Isolierung neuer lagerungsexprimierter Gene der Zuckerrübe“

Dissertation

Ab 06/2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in Forschung und Lehre, Institut für Genetik (Prof. Hehl), TU Braunschweig
------------	--